Die Acetylcholinbildung der Honigbiene sowie der Nachweis einer arsenolysefreien Phosphotransacetylase eines Milchsäurebakteriums

---

von
Horst Roselieb
aus Weißenfels/Saale

1966

1966 № 74

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535706_0018

Die Acetylcholinbildung der Honigbiene sowie der Nachweis einer arsenolysefreien Phosphotransacetylase eines Milchsäurebakteriums

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Horst Roselieb

aus

Weißenfels / Saale

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Tag der mündlichen Prüfung : 16. Februar 1966.

Dekan : Universitätsprofessor Dr. phil. E. W i r t h.

Berichterstatter : Universitätsdozent Dr. H. S u c k e r.

Berichterstatter : Universitätsprofessor Dr. O. D a n n.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1963 bis Dezember 1965 im Institut für Angewandte Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg ausgeführt.

Meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Professor Dr. O. D a n n und Herrn Universitätsdozent Dr. H. S u c k e r, danke ich sehr herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, ihr stets förderndes Interesse an ihrem Fortgang und für viele wertvolle Ratschläge bei ihrer Durchführung.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Aus Acetontrockenpulver der Honigbiene (Apis melifera carnica) ließ sich ein wäßriger, zellfreier Extrakt bereiten, in dem eine Mn^{++}- oder Mg^{++}-bedürftige Acetokinase, eine Phosphotransacetylase ohne Arsenolyse, eine Cholinacetylase, eine Myokinase, eine ATPase und eine saure Acetylphosphatase, jedoch keine Acetthiokinase nachgewiesen werden konnte.

2) Im Gegensatz zu der Stubenfliege (Musca domestica) konnte eine Anreicherung der einzelnen Enzyme nicht mit herkömmlichen Methoden erreicht werden. Durch Chromatographie an Molekularsieben (Sephadex^{R}) und Sephadex^{R}-Ionenaustauschern konnte gezeigt werden, daß die drei besonders bearbeiteten Enzyme Acetokinase, Phosphotransacetylase und Cholinacetylase, trennbar sind.

3) Nach Behandeln des Extraktes durch Erhitzen und fraktioniertes Fällen mit Ammonsulfat und Aceton wurde die beste Anreicherung mit Fraktionen aus Molekularsieben erzielt. Es konnte eine Acetokinase, eine Phosphotransacetylase I und eine Fraktion Phosphotransacetylase II + Cholinacetylase gewonnen werden.

4) Die früher beschriebene Acetylcholin syntheti sierende Transacetylase der Milchsäurebakterien (Streptobacterium plantarum 10 S) konnte durch Chromatographie an Molekularsieben (Sephadex^{R}) in eine arsenolysefreie Phosphotransacetylase sowie in eine Phosphotransacetylase mit Arsenolyseaktivität und in ein Gemisch arsenolysefreier Phosphotransacetylase und Cholinacetylase getrennt werden.

Inhaltsverzeichnis

		Seite:
I	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Trivialnamen	1
II	Einleitung	3
III	Theoretischer Teil	10
	A) Analytische Methoden und Inkubationsbedingungen	10
	a) Bestimmung der Enzymaktivitäten	10
	b) Bestimmung des Proteins	12
	B) Der zellfreie Extrakt der Biene	13
	a) Acetylcholinsynthetisierende Fermente	13
	b) Hemmstoffe	16
	C) Reinigungsversuche der einzelnen Fermente	17
	a) Versuche zur Vortrennung	17
	b) Versuche an Ionenaustauschern	19
	c) Versuche an Molekularsieben	21
	α) Theorie der Molekularsiebe	21
	ß) Konzentrierung von Enzymlösungen	25
	γ) Chromatographische Methoden	26
	δ) "Zone Precipitation"	29
	D) Versuche mit gereinigten Enzymen	30
	a) Acetokinase	30
	b) Die Michaelis-Menten-Konstante	31
	c) Phosphotransacetylase	36
	d) Acetylcholin-Synthese	37
	E) Trennung von Milchsäurebakterien-Enzymen an Molekularsieben	38
	F) Unterschiede zwischen Bienen- und Fliegenenzymen	41
IV	Experimenteller Teil	44
	A) Analytische Methoden und Inkubationsbedingungen	44
	a) Protein	44
	α) Biuretreaktion	44
	ß) Methode nach L`o w r y	44

γ) U. V. -Absorption 45
δ) Fluoreszenzmethode 46
b) Acetylphosphat 48
α) Bestimmung von Acetylphosphat 48
ß) Entfernen von Acetylphosphat im Acetokinasetest 48
c) Acetylcholin 49
α) Biologische Methode 49
ß) Chemische Methode 50
d) Inkubationsbedingungen 51
α) Allgemeines 51
ß) Acetokinase 51
γ) Acetylcholinsynthese zur Prüfung der Phosphotransacetylase und Cholinacetylase 51
1) Inkubationslösung 51
2) Acetylphosphatdarstellung 51
3) Fliegenenzyme 52
B) Der zellfreie Extrakt der Biene 52
a) Herkunft der Bienen, Bereitung von Acetontrockenpulver und Extrakt 52
α) Herkunft der Bienen 52
ß) Herstellung von Acetontrockenpulver der Biene 53
γ) Gewinnung von zellfreiem Extrakt 53
b) Nachweis von Acetokinase, Phosphotransacetylase und Cholinacetylase 54
c) Nachweis von Myokinase 57
d) Nachweis von ATPase 57
e) Nachweis von saurer Acetylphosphatase 59
f) Versuch zum Nachweis von Acetthiokinase 59
g) Hemmstoffversuche mit Extrakt 60
C) Reinigungsversuche der einzelnen Enzyme 61
a) Versuche zur Vortrennung 61
α) Vorversuche 61
ß) Endgültige Vortrennung des zellfreien Extraktes, Bienenfraktion Mc 66

b) Chromatographische Methoden 68
α) Ionenaustauscher 68
1) Vorbehandlung der Ionenaustauscher 68
2) Bau eines linearen Gradientenmischers 68
3) DEAE-Sephadex 70
4) CM-Sephadex 74
5) SE-Sephadex 76
6) Phosphorylcellulose 76
ß) Versuche an Molekularsieben 78
1) Der Fraktionsschneider 78
2) Methodik 80
3) Chromatographie an Molekularsieben 81
4) "Zone Precipitation" 85
D) Eigenschaften der gereinigten Enzyme 88
a) Acetokinase 88
α) Ionenbedürfnis 88
ß) p_H-Abhängigkeit 90
γ) Reaktionskinetik 90
δ) Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für ATP als Substrat 93
b) Phosphotransacetylase I 94
α) Reaktionskinetik 94
ß) Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für ATP als Substrat 97
c) Acetylcholinsynthese aus Acetylphosphat 98
E) Trennung von Milchsäurebakterien-Enzymen an Molekularsieben 100

Literaturverzeichnis 105

Lebenslauf 113

I) Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Trivinalnamen.

Die in dieser Arbeit benutzten Abkürzungen bedeuten

Aç	Acetat, Acetyl
AcCh	Acetylcholin
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
AcP	Acetylphosphat
$AcPLi_2$	Dilithiumsalz des Acetylphosphats
ATP	Adenosintriphosphat, Dinatriumsalz mit 4 H_2O
ADP	Adenosindiphosphat, Trinatriumsalz mit 1 H_2O
AMP	Adenosinmonophosphat mit 2 H_2O
Ch	Cholin
P	Phosphat
PP	Pyrophosphat
CoA	Coenzym A

Die Fermente wurden mit den üblichen, nachstehend unterstrichenen Trivialnamen bezeichnet. Nach dem Report of the Commission of Enzymes of the International Union of Biochemistry (I.U.B.) (1961), Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1961 S. 61 ff werden folgende Bezeichnungen vorgeschlagen:

Cholinacetylase: 2.3.1.6 Acetyl-CoA : Cholin O-acetyltransferase; Cholin Acetyltransferase.

Phosphotransacetylase: 2.3.1.8 Acetyl-CoA : Orthophosphat Acetyltransferase ; Phosphatacetyltransferase.

Acetokinase: 2.7.2.1 ATP : Acetat Phosphotransferase ; Acetatkinase.

Myokinase: 2.7.4.3 ATP : AMP Phosphotransferase ; Adenylatkinase.

Acetylcholinesterase: 3.1.1.7 Acetylcholin Acetyl-Hydrolase ; Acetylcholinesterase.

Pseudocholinesterase: 3.1.1.8 Acetylcholin Acyl-Hydrolase ; Cholinesterase.

Phosphatase (saure) : 3.1.3.2 Orthophosphorsäuremonoester Phosphohydrolase ; saure Phosphatase.

ATPase: 3.6.1.4 ATP Phosphohydrolase ; ATPase.

Acetthiokinase: 6.2.1.1 Acetat: CoA Ligase AMP ; Acetyl-CoA synthetase.

II) Einleitung

Das Acetylcholin ($CH_3COO \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot \overset{+}{N}(CH_3)_3$) ist seit seiner Entdeckung im Organismus durch O. Loewi [1] im Jahre 1921, der es auf Grund seiner Wirkung als "Vagusstoff" ansprach, in mannigfachen Organismen nachgewiesen worden. Die einzig bisher bekannte physiologische Wirkung des AcCh ist die Übertragung von Nervenreizen. In verschiedenen Organismen wie z. B. in einigen Bakterien, im Mutterkorn [2], in der Kartoffel [3] und in den Brennnesselhaaren [4], wie auch in den Erythrocyten [5], ist solch ein klarer Zusammenhang zwischen Vorkommen und Wirkung nicht zu finden. Desgleichen fragt man sich, warum Bienenhonig einen Gehalt an AcCh bis zu 5 mg pro kg aufweisen kann [6]. Der Bildungsort des AcCh im Honig ist noch unbekannt.

Die weite Verbreitung und die physiologische Bedeutung des AcCh war der Anlaß, seine Biogenese aufzudecken. D. Nachmansohn u. Mitarb. [7] konnten erstmalig 1952 nachweisen, daß AcCh durch Cholinacetylase aus AcCoA und Cholin synthetisiert wird (Gleichung 1).

$$(1) \quad AcCoA + Ch \xrightarrow{\text{Cholinacetylase}} AcCh + CoA$$

Im gleichen Jahr zeigten F. Lipmann und Mitarb. [8], daß AcCoA aus ATP und Acetat unter Abspaltung von Pyrophosphat durch Acetatthiokinase gebildet wird (Gleichung 2)

$$(2) \quad ATP + Ac + CoA \xrightarrow{\text{Acetthiokinase}} AcCoA + AMP + PP$$

Diese Reaktionen waren schon 1943 von D. Nachmansohn [10] allerdings ohne genauere Einzelheiten im Hirn beobachtet worden.

AcCoA kann auch von anderen bekannten Donatorsystemen aus

dem Fettsäure-, Kohlenhydrat- und Aminosäure-Stoffwechsel geliefert werden. Auch aus ATP führt ein weiterer Weg zum AcCoA, die Synthese über AcP [11, 12] (Gleichung 3)

(3) $ATP + Ac + CoA \longrightarrow AcCoA + ADP + P$

(3a) $ATP + Ac \xleftarrow[Mg^{++}]{\text{Acetokinase}} AcP + ADP$

(3b) $AcP + CoA \xrightarrow{\text{Phosphotransacetylase}} AcCoA + P$

Dieser Zweistufenmechanismus verlangt eine Mg^{++}-Ionen-bedürftige Acetokinase, die aus ATP und Acetat AcP und ADP bildet (Gleichung 3a) und anschließend eine Phosphotransacetylase, die vom AcP den Ac-Rest auf CoA überträgt (Gleichung 3b). Dieser zweite Weg zu AcCoA soll nur in Mikroorganismen, nicht in tierischen oder pflanzlichen Zellen und auch nicht in Hefe anzutreffen sein [11]. Erstmalig wurde von O. D a n n und A. R o t h [13] das Vorkommen einer Phosphotransacetylase (Gleichung 3b) in der Stubenfliege (Musca domestica) nachgewiesen. Die Acetokinase (Gleichung 3a) der Fliegen wurde im gleichen Laboratorium 1965 von H. S u c k e r [14] gefunden. Ebenso war Acetokinase und Phosphotransacetylase in Hefe nachweisbar [15]. Dies berechtigt zu der Hoffnung, allgemein in höheren Lebewesen mit geeigneten Mitteln diesen zweiten Bildungsweg vom ATP zum AcCoA aufzufinden.

Das in der Acetokinasereaktion gebildete ADP kann durch Myokinase disproportioniert werden (Gleichung 4).

(4) $2\ ADP \xleftrightarrow{\text{Myokinase}} ATP + AMP$

Dieses Mg^{++}-Ionen-bedürftige Enzym wurde erstmals von S.P. C o l o w i c k und H.M. K a l c k a r [16, 17] aus Skelettmuskel von Wirbeltieren dargestellt. Es wurde später u.a. in Rattenleber, im Gehirn, in Nerven, in der Niere, im Insektenmuskel, in Bakterien [18] und in der Stubenfliege [14] nachgewiesen [17].

Die physiologische Bedeutung dieses Enzyms kann einmal die Bildung von ADP aus AMP sein, welches dann z. B. bei der Glykolyse zu ATP resynthetisiert wird. Ferner kann dadurch die Energie der beiden Phosphorsäureanhydridbindungen des ATP ausgenutzt werden. So ergibt sich aus den Gleichungen 3 und 4 , daß 2 Moll. AcCoA aus einem Mol. ATP gebildet werden (Gleichung 5).

(5) $ATP + 2Ac + 2\,CoA \longrightarrow 2AcCoA + AMP + 2P$

Die Entdeckung der Phosphotransacetylase im Extrakt vom Clostridium kluyveri geht auf E. R. S t a d t m a n [11, 19, 20] und seine Schule zurück. Er hatte durch das Auftreten der sogen. Arsenolyse einen ersten Fingerzeig erhalten und war diesem erfolgreich nachgegangen. Als Ergebnis wurde postuliert, daß Phosphotransacetylase in einer Gleichgewichtsreaktion vom AcP den Ac-Rest auf CoA überträgt (Gleichung 3b). Bei Anwesenheit von Arsenat erfolgt jedoch die Rückreaktion partiell mit Arsenat, so daß Ac-Arsenat entsteht, das in Wasser sofort in Ac und Arsenat zerfällt (Gleichung 6).

(6) $\text{Ac-Arsenat} + \text{CoA} \xleftrightarrow{\text{Phosphotransacetylase}} \text{AcCoA} + \text{Arsenat}$

$\downarrow + H_2O$

$\text{Ac} + \text{Arsenat}$

Als Summenreaktion von Gleichung 3 und 6 erhält man ein durch Arsenation, CoA, K^+ und Enzym katalysierte Hydrolyse des AcP (Gleichung 7).

(7) $AcP + H_2O \xrightarrow[\text{CoA; Arsenat } K^+]{\text{Phosphotransacetylase}} Ac + P$

E. R. S t a d t m a n nahm an, daß Arsenolyse eine allgemeine Reaktion der Phosphotransacetylase darstellt und reicherte das Enzym mit Hilfe dieses schnellen und überschaubaren Testes an. Auch andere Autoren fanden, daß bei Mikroorganismen vorkommende Phosphotransacetylase diese Reaktion zeigte [11]. O. D a n n und A. R o t h [13]

konnten aus der Stubenfliege im Jahre 1958 nicht nur erstmals eine Phosphotransacetylase außerhalb des Einzellerreiches isolieren, sondern sie fanden auch noch, daß dieses Ferment keine Arsenolyse zeigte. Dafür besaß es aber die zusätzliche Eigenschaft einer Acetylphosphatase [13] und wurde von den Autoren als eine Acetylphosphat-spaltende Phosphotransacetylase angesprochen. Später ließ sich die Phosphotransacetylase von der sauren Acetylphosphatase teilweise trennen [14]. Somit durfte man annehmen, daß es zwei Typen von Phosphotransacetylasen gibt: Solche ohne Arsenolyse in höheren Organismen und eine "Niedere Phosphotransacetylase" bei Bakterien, die nicht zwischen Phosphat und Arsenat unterscheiden kann. Daß es sich bei der Arsenolyse tatsächlich um die formulierten Schritte handelt, wurde nicht nur von E. R. S t a d t m a n [21] selbst, sondern auch von I. E. V a r n e r und Mitarb. [22] an der Glutaminsynthetase, die ebenfalls eine Arsenolyse zeigt, durch Verwendung von markiertem Sauerstoff nachgewiesen.

E. R. S t a d t m a n fand, daß Phosphotransacetylase zur vollen Aktivität K^+- oder NH_4^+-Ionen benötigt [11]. Bei Streptobacterium plantarum 10S [18] konnte bewiesen werden, daß die Phosphotransacetylase zwar zur Arsenolyse K^+- oder NH_4^+-Ionen, jedoch zur Acetylierung von CoA keinerlei Kationen bedarf. Diese Feststellung wurde besonders unterstrichen. Man konnte also damit rechnen, daß entweder der Mechanismus der Arsenolyse nicht voll geklärt war, oder daß es ein Ferment gab, das die Arsenolyse gesondert veranlaßt. Da allgemein der Nachweis der Phosphotransacetylase-Aktivität mit der Arsenolysereaktion versucht worden war [21], konnte deren Nachweis nicht gelingen, sondern gelang erst durch die Kombination mit Cholinacetylase und der Bildung von AcCh.

Die Zweigleisigkeit des Organismus, AcCoA aus ATP zu bilden, wird dadurch erklärt [15], daß das Acetthiokinase-System zur Bildung des AcCoA und das AcP-System zur Gewinnung von ATP als

Energiespeicher aus anderen AcCoA-liefernden Reaktionen zur Verfügung steht. Die Bildung von AcCoA durch Acetthiokinase verläuft nämlich nur in dieser einen Richtung, weil das abgespaltene Pyrophosphat durch eine Pyrophosphatase abgebaut wird, wodurch es aus dem Gleichgewicht verschwindet.

Aus den obigen Erörterungen läßt sich zusammenfassend folgender Zyklus aufstellen: (Abb. 1)

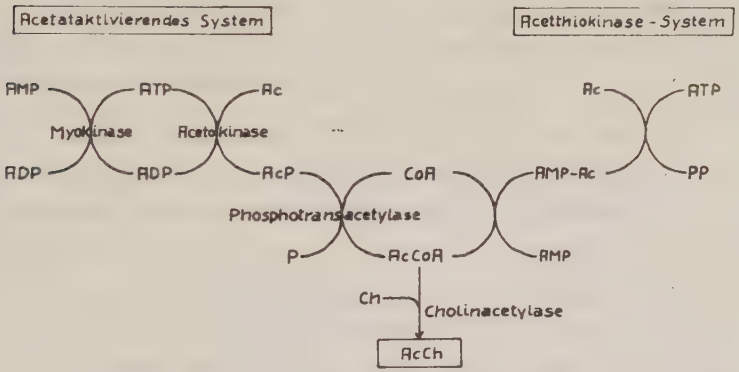


Abbildung 1

Das AcCh-bildende und AcCh-hydrolysierende Ferment, die Cholinacetylase und die Cholinesterase, spielen in den cholinergen Fasern der Wirbeltiere und im Nervensystem niederer Tiere wie bei den Insekten und Würmern eine entscheidende Rolle bei der Reizübertragung im Nerven und an den Schaltstellen zur Muskulatur [23]. Das durch einen Reiz vom Speicherprotein abgegebene AcCh gelangt an ein Rezeptorprotein, das eine Durchlässigkeit der Nervenzellmembran für Na^+-Ionen induziert. Durch die entstehende Depolarisation wird bei der saltatorischen Nervenreizleitung ein neuer Impuls auf die nächste Nervenstrecke oder an der Muskelendplatte eine Kontraktion ausgelöst. Cholinesterase zerstört dann in sehr kurzer Zeit diese Wirkung durch Spaltung des Esters, so daß die Nervenbahn erneut bereit ist, einen Impuls zu übertragen.

Bei einer Gruppe von Insektiziden macht man sich die Hemmbarkeit der Cholinesterase zunutze. Durch Phosphorsäureester wie z. B. Paraoxon (E 600 ^{R} ; Mintacol ^{R}) wird der Abbau des AcCh am Rezeptor verhindert, es kommt zu einer Dauerdepolarisation und einer Überschwemmung des gesamten Organismus durch AcCh. Das Insekt stirbt im Krampf. Das gleiche tritt beim Menschen bei Vergiftungen durch esterasehemmende Insektizide auf. Dabei macht sich besonders schwer eine ungehemmte Weiterproduktion von AcCh bemerkbar [23], die durch Gaben von Cholinacetylasehemmstoffen gemildert werden könnte. Im pharmakologischen Versuch konnten M. J. Bleiberg und Mitarb. [24] 1962 die Wirkung eines solchen Hemmstoffes, Di-(p-chlorphenyl)-essigsäure, beobachten. Durch Isolierung von Insekten-Cholinacetylase könnte man die Hemmung unbeeinflußt von unkontrollierbaren physiologischen Vorgängen im Reagenzglas prüfen. Bei analogen Hemmversuchen mit Carbonsäuren verschiedener spasmolytisch wirksamer Ester, z. B. Diphenylbuttersäure, wurde von O. Dann und H. Sucker [25] 1962 zwar eine Verminderung der AcCh-Ausbeute bei Fliegenextrakten und Extrakten aus Meerschweinchenhirn festgestellt. Diese beruhte

aber nur auf der Hemmung der Acetat-aktivierenden Enzyme und nicht auf einer spezifischen Hemmung der Cholinacetylase.

Insektizide sind im allgemeinen sowohl für Schädlinge wie auch für Nutzinsekten schädlich. Es ist somit das volkswirtschaftliche Interesse begründet, Insektizide zu finden, die selektiv auf Schädlinge wirken, z. B. aber für die Honig-Biene (Apis melifera) unschädlich sind.

Das engere Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Enzymgarnitur, welche die Synthese von AcCh in der Honigbiene bewerkstelligt, aufzufinden, anzureichern, nach Möglichkeit zu isolieren und den Bildungsweg aufzuklären.

Ferner interessierte die Frage, ob die Acetaktivierung ebenfalls durch Acetokinase und Phosphotransacetylase möglich ist und ob sie damit im Tierreich weiter verbreitet ist als man bisher angenommen hat.

Die Bienen wurden hierfür ausgewählt, da einer Anregung Herrn Professor D u s p i v a 's , Heidelberg, zufolge, diese einen hochorganisierten Staat bilden und damit auf einer höheren Entwicklungsstufe stehen als die schon untersuchten Stubenfliegen. Von besonderem Interesse war die Frage, ob die Enzymproteine von Fliegen und Bienen in ihren Eigenschaften vergleichbar sind, oder ob sich Unterschiede ergeben, die z. B. für die Synthese von selektiven Insektiziden ausgenützt werden können. Es mußte allerdings durch das Vorkommen von AcCh im Honig damit gerechnet werden, daß die aufgefundenen Enzyme nicht nur aus dem funktionellen Gewebe der Nervenreizleitung und Muskelbewegung stammen.

III) Theoretischer Teil

A) Analytische Methoden und Inkubationsbedingungen

a) Bestimmung der Enzymaktivitäten

Der vorliegenden Arbeit lag als Hypothese die Annahme zu Grunde, daß es bei der Honigbiene einen Syntheseweg zum AcCh gibt, der in seinen Schritten dem bei Bakterien [26] und Fliegen [14] gleicht. Dieser Weg besteht aus folgenden drei Stufen:

$$ATP + Ac \xleftarrow[Mg^{++}]{\text{Acetokinase}} AcP + ADP$$

$$AcP + CoA \xleftarrow{\text{Phosphotransacetylase}} AcCoA + P$$

$$AcCoA + Ch \xrightarrow{\text{Cholinacetylase}} AcCh + CoA$$

$$ATP + Ac + Ch \xrightarrow{CoA} ADP + AcCh + P$$

Zur Überprüfung der Fermentaktivitäten wurden die schon früher in unserem Laboratorium [27, 28] entwickelten Inkubationsbedingungen beibehalten.

Die Messung der Acetokinaseaktivität erfolgte durch Bestimmung des aus ATP gebildeten AcP. Da das Gleichgewicht der AcP-Bildung aus ATP und Ac sehr stark auf seiten des ATP [29, 30] liegt und bei längeren Inkubationszeiten die Gefahr der Hydrolyse von AcP besteht, so ist es nötig, das gebildete AcP aus dem Gleichgewicht durch die Umsetzung zur Hydroxamsäure mit Hydroxylamin zu entfernen. Dadurch kann aber eine mögliche Hemmung durch Hydroxylamin nicht beobachtet werden.

Die Messung der Cholinacetylaseaktivität kann durch Bestimmung des gebildeten AcCh aus AcCoA und Ch erfolgen. Dafür standen zwei Methoden zur Verfügung, die sich gegenseitig gut ergänzten. Die eine, zeitraubendere, biologische Methode mit dem Blutegelrükkenmuskel nach H. F ü h n e r [31] war verläßlich durch ihre Spezifität und sehr nutzbringend für niedere AcCh-Ausbeuten, da noch 0,05 - 0,1 γ AcCh sicher nachgewiesen werden können. In dieser Größenordnung muß man allerdings mit Fehlern von ca. ± 20 % rechnen. Die andere, chemische, quantitative Bestimmung von AcCh als Acethydroxamsäure nach S. H e s t r i n [32] spricht auf alle Ester, Säureanhydride, Säurechloride und -amide an und verlangt vor allem klare Lösungen. Man kann sie nur anwenden, wenn man sicher ist, daß die Enzymfraktion soweit gereinigt ist, daß sie außer AcCh keine anderen Ester bildet. Unterhalb eines Gehaltes von 50γ AcCh/ml (das entspricht einer Extinktion von 0,05) erbringt sie keine mit dem Blutegeltest vergleichbaren Werte mehr. Nach K. D o e r f f e l [33] sollten sogar die Extinktionen zwischen 0,6 und 0,4 liegen, um eine maximale Genauigkeit im Spektralphotometer zu ergeben. In den meisten Fällen war für uns allerdings die Genauigkeit von untergeordnetem Interesse, wenn es darum ging, nachzuweisen, ob eine Enzymaktivität abgetrennt war oder nicht.

Der Nachweis der Phosphotransacetylase und der Cholinacetylase erfolgte durch die Bestimmung des aus AcP gebildeten AcCh. Daher war der Zusätz von Fliegen-Cholinacetylase bei der Bestimmung von Bienen-Phosphotransacetylase notwendig, ebenso wie der Zusatz von Fliegen-Phosphotransacetylase [12], oder Bakterien-Phosphotransacetylase bei der Bestimmung der Bienen-Cholinacetylase. Die enzymatische AcCh-Bildung ist nur ein Indikator für das Vorliegen der gesuchten Enzymaktivität und kein Maß für deren Höhe. In den rohen, ungetrennten Anreicherungen addieren sich die Aktivität von Bienen- und Hilfsenzym, bei angereicherten Präparaten kann die Aktivität des Hilfsenzyms der die Ausbeute bestimmende Faktor werden.

b) Bestimmung des Proteins

Die im Laboratorium verwendete Proteinbestimmungsmethode beruhte auf der Biuret-Reaktion [34] von Cu-Ionen mit dem Stickstoff von Peptidbindungen [35]. Diese Methode hatte aber zwei Nachteile: sie ließ sich nur verwenden für Proteingehalte $> 0,5$ mg/ml, wobei 2 ml Enzymlösung notwendig waren. Ferner enthält der Bienenextrakt Glukose und Fruktose, die aus der Biene stammen und das Ergebnis fälschen können. Es tritt nach längerem Stehen der Biuretlösung mit Extrakt ein rotgelber Niederschlag von Kupfer (I)-oxid auf, der bei angereicherten Fraktionen ausbleibt.

Als empfindlichere Methoden boten sich die Farbreaktion nach O.H. Lowry u. Mitarb. [36] und die U.V.-Absorption nach O. Warburg u. W. Christian [37] an. Die erste Methode verbindet zwei Prinzipien: die Biuret-Reaktion nach T.E. Weichselbaum [34] und die Phenolbestimmung nach O. Folin und V. Ciocalteu [38]. D. Glässer u. R. Kleine [39] geben ein Absorptionsmaximum von 680 mμ an, räumen aber ein, daß andere Autoren auch 750 mμ fanden. Die Messung des Absorptionsspektrums ergab auch bei uns ein Maximum bei 750 mμ.

Zur Eichung setzten wir verschiedene Verdünnungen von LABTROL (DADE-REAGENTS, Inc., Miami) [40] ein und fanden, daß 294 γ Serumeiweiß eine Extinktion von 1,0 ergaben. Eine angereicherte Bienenfraktion, deren Proteingehalt zuvor mit der Biuret-Methode festgelegt worden war, ergab in diesem Test einen Wert von 880γ Eiweiß für eine Extinktion von 1,0. Um diese Überschneidung auszuschalten, entschlossen wir uns, den letzten Wert, der an die Biuret-Methode anschloß, aus praktischen Gründen beizubehalten.

Die zweite Methode, nach der die Extinktion bei 280 mμ der Proteinkonzentration proportional gesetzt wird, beruht auf dem Gehalt an Tryptophan und Tyrosin [37a]. Der grundsätzliche Unterschied der zwei Methoden bringt es mit sich, daß besonders bei hochgerei-

nigten Proteinen, deren Aminosäurezusammensetzung nicht mehr gleich ist, die Ergebnisse auch nicht mehr übereinstimmen.

Eine weitere Möglichkeit, den Proteingehalt festzustellen, bietet die Messung der Fluoreszenz nach V.G. Shore u. A.B. Pardee [41,42]. Das bei 280 mμ absorbierte Licht wird bei 340 mμ als Fluoreszenzstrahlung wieder abgegeben. Die Diskussion dieses Phänomens ist noch nicht abgeschlossen [41], da die Ursachen noch nicht geklärt werden konnten. Es scheint vor allem die Umgebung der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan im Protein eine große Rolle bezüglich der Fluoreszenzausbeute und - maxima zu spielen. Der große Vorteil der Methode ist der, daß Nukleinsäuren, Purine und Pyrimidine keine Fluoreszenz in den betreffenden Gebieten aufweisen, jedoch bei 280 mμ absorbieren [41]. Ein Nachteil liegt in dem großen Aufwand, der zu dieser Bestimmung nötig ist.

B) Der zellfreie Extrakt der Biene

a) Acetylcholinsynthetisierende Fermente

Um zu den gewünschten AcCh-synthetisierenden Enzymen der Biene zu gelangen, wurde zunächst versucht, die von O. Dann u. A. Roth [13] bei Stubenfliegen erfolgreiche Aufarbeitung auf Bienen zu übertragen. Es hatte sich damals gezeigt, daß sich als Ausgangsmaterial Acetontrockenpulver aus kältestarren Fliegen bewährte, wie es erstmals von W. Feldberg [43] und D. Nachmansohn [10] beschrieben wurde. Dadurch wird die Verdauung der Pro-

teine durch Proteasen unterbunden und die Cholinesterase stark geschädigt [44]. Einer Kältebehandlung zur besseren Handhabung der erstarrten Tiere entzogen sich die Bienen, die sich eng zusammenschlossen und durch heftiges Schwirren ihren Stoffwechsel zur Wärmeproduktion anregten. Eine Narkose mit Äther oder Chloroform war nur nach Verwendung ungewöhnlich großer Mengen erfolgreich. Ein schnelleres Verfahren ergab sich durch eine Kohlendioxid-Narkose. Da das Gas schwerer als Luft ist, läßt es sich gut in Gefäßen handhaben. Alle weiteren Schritte bis zum Extrakt verliefen dann nach dem üblichen Schema, der Gewinnung eines Acetontrockenpulvers und der Bereitung eines wäßrigen, zellfreien Extraktes.

Die Untersuchung zeigte, daß der zellfreie Extrakt AcCh sowohl aus ATP wie auch aus AcP bildet (Tabelle 2,3 S. 55).

Aus ATP wurde ohne CoA eine kolorimetrierbare Hydroxamsäure bei Anwesenheit von Hydroxylamin gebildet (Tabelle 1). Diese Reaktion wurde von Fluorid stark gehemmt (Tabelle 7, S. 57). Bei Anwesenheit von CoA wurde die Synthese nur unbedeutend erhöht, die Fluoridhemmung wurde nicht beeinflußt (Tabelle 12, S. 59). Damit war eine Acetokinase nachgewiesen, die die gleiche Eigenschaft wie die der Fliegen [14], des Streptobacterium plantarum 10S [45] und der Bäckerhefe [15] besaß.

Eine Acetthiokinase konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen von D.D. Hoskins u. Mitarb. [46] im Extrakt aus Acetontrockenpulver der Biene nicht nachgewiesen werden. Die Autoren untersuchten die Mitochondrien des Thorax und gingen dabei naturgemäß von einer anderen Aufarbeitung aus, so daß man annehmen muß, daß die Acetthiokinase der Bienen durch unsere Acetonbehandlung zerstört wurde. Die Mitochondrien zeigten keine Acetokinaseaktivität [46]. Diese ist also wahrscheinlich in der Biene an anderer Stelle zu suchen.

Die Bildung von AcCh aus AcP deutete das Vorhandensein einer

Phosphotransacetylase und einer Cholinacetylase an. Die Phosphotransacetylase zeigt keine Arsenolyse (Tabelle 38, S. 99). Mit diesem Ergebnis ist erneut nachgewiesen, daß arsenolysefreie Phosphotransacetylase nicht nur bei den Fliegen und in der Hefe vorkommt, sondern offenbar eine weitere Verbreitung hat als man nach Untersuchungen an Bakterien ursprünglich angenommen hat [11].

Im Extrakt konnte Myokinase (Tabelle 8, S. 57), ATPase (Tabelle 9, S. 57) und eine außerordentlich starke saure Phosphatase (Tabelle 10, S. 59) nachgewiesen werden. Sie ließ sich nicht durch Fluorid hemmen (Tabelle 11).

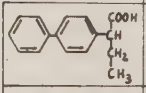
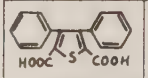
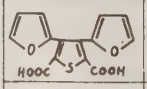
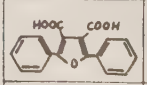
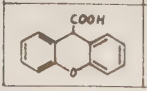
Phosphatase und ATPase sind beides hydrolysierende Fermente, die Säureanhydridbindungen spalten [47]. Ihre Aufgaben im Organismus sind noch nicht eindeutig geklärt. Da durch die Art der Enzymaufarbeitung ein sinnvoll eingerichteter, biologischer Aufbau zerstört wird, ist es schwierig, die Eigenschaften, die ein Enzym in vitro entwickelt, auf den Organismus zu übertragen, wenn man die ursprünglichen Zusammenhänge nicht kennt. Die Eigenschaft, AcP zu spalten, erscheint uns einerseits sinnlos, da die energiereiche Bindung ohne Grund zerstört wird. Andererseits könnte dieses verhältnismäßig unspezifische Enzym ganz andere Aufgaben im Zusammenhang einer Reaktionskette besitzen. Es könnte auch wie Cholinesterase die Umgebung bestimmter Organellen gegen äußere Einflüsse abschirmen.

Von der ATPase weiß man, daß sie bei der Muskelkontraktion eine entscheidende Rolle spielt [46]. Da sie im Organismus auch sonst weit verbreitet ist, hat man sie im Zusammenhang von Ionentransportmechanismen [49] und Elektronenübertragungen [47] diskutiert. Sie konnte auch schon in den Flugmuskeln von Insekten [50] und insbesondere in Myofibrillen der Flugmuskeln der Arbeiterbiene nachgewiesen werden [51].

b) Hemmstoffe

Verschiedene substituierte Essigsäuren [25] und ringständig carboxylierte aromatische Dicarbonsäuren [52] hemmen die AcCh-Synthese aus ATP und die AcP-Synthese aus ATP im Fliegenextrakt. Es interessierte die Frage, ob diese Hemmungen auch im Bienenextrakt nachzuweisen waren, und ob die Reihenfolge der Wirkungsstärke bei Fliegen und Bienen identisch ist. Zwischen Meerschweinchenhirn und Fliegen waren früher Unterschiede gefunden worden [25].

Aus einer Garnitur von 16 Verbindungen wurden die fünf besten ausgesucht und mit Bienenextrakt getestet (Tabelle 13). Es zeigte sich, daß auch hier 2.5-Diphenyl-furan-dicarbonsäure-(3.4) die grösste Wirkung, aber keine so starke wie bei Fliegen erzielte. Die Reihenfolge der anderen Säuren war etwa die gleiche, wie das folgende Schema zeigt. Die im Schema angegebenen Werte sind die Quotienten aus gebildetem $AcPLi_2$ oder AcCh mit Hemmstoffzusatz und gebildetem $AcPLi_2$ oder AcCh ohne Hemmstoffzusatz.

Hemmstoffe:	Acetokinase		AcCh-Synthese aus ATP		AcCh-Synthese aus AcP	
	Fliegen	Bienen	Fliegen	Bienen	Fliegen	Bienen
	0,4	0,8	0,4	0,7	0,7	0,8
	0,5	0,6	0,3	0,7	0,4	1
	0,7	0,7	0,15	0,5	0,6	1
	0,4	0,6	<0,15	0,3	0,3	0,7
	0,3	0,5	0,3	0,5		0,5

C) Reinigungsversuche der einzelnen Fermente

a) Versuche zur Vortrennung

Nach der Extraktion des Acetontrockenpulvers und nach dem Nachweis der postulierten AcCh-Synthese im Extrakt, war das nächste Ziel die Auftrennung und möglichst reine Isolierung der einzelnen Fermente. Dabei lag zunächst der Gedanke nahe, daß die Verhältnisse bei den Fliegen [14, 28] sich auf die der Bienen übertragen ließen. In dieser Hoffnung sahen wir uns jedoch getäuscht. Es war nicht möglich, mit Hilfe der "klassischen Methoden" [53] wie fraktionierte Fällungen mit anorganischen Salzen oder organischen Lösungsmitteln oder mit der Säurefällung nach H. K u m a g a i und S. E b a s h i [28, 54] Trennungen oder selektive Denaturierung zu erhalten (Tabellen 16, 17, 18, 18a). Die unzureichende Trennung mit Ammonsulfat ist nicht auf örtliche Konzentrationsniederschläge zurückzuführen, da Versuche mit konzentrierter Ammonsulfatlösung das gleiche Ergebnis lieferten. Die Säurefällung führte sogar zu einer Schädigung (Tabellen 14, 15 , S. 61, 62) aller gesuchten Enzyme, wenn man den Extrakt bei p_H 4, 5 im Kühlschrank aufbewahrte. Acetokinase, die diese Behandlung am besten überstand, fand sich dann sowohl im Niederschlag wie im Überstehenden.

Alkohol-Fällungen mit Äthyl- und n-Propylalkohol führten zu wenig befriedigenden Ergebnissen (Tabellen 19, 20, S. 65). Äthylalkohol ergab eine gute Acetokinaseausbeute bei Inaktivierung von Cholinacetylase und nur geringer Schwächung von Phosphotransacetylase. n-Propylalkohol inaktivierte teilweise Acetokinase und Phosphotransacetylase. Die Fällungen mit Äthylalkohol verliefen im Gegensatz zu den Acetonfällungen sehr langsam. Es mußte eine Stde. gewartet werden, bis der Niederschlag quantitativ gefallen war und abzentrifugiert werden konnte.

Acetonfällungen vor oder nach einer Ammonsulfatfällung brachten zwar keine Auftrennung, aber eine Anreicherung des gesamten Enzymkomplexes. Bei fallender Proteinkonzentration nahmen die Aktivitäten von Acetokinase, Phosphotransacetylase und Cholinacetylase zu (Tabelle 18, 18a), vermutlich durch Inaktivierung von ATPase und Acetylphosphatase.

Bei dem Versuch, durch Erhitzen [53] eine selektive Inaktivierung, beziehungsweise Ausfällung inaktiven Proteins zu erreichen, zeigte sich, daß die gesuchten Fermente eine bemerkenswerte Hitzestabilität aufwiesen (Tabellen 5 und 6). Für gewöhnlich kann man annehmen, daß Proteine zwischen 40 und 50° C langsam denaturiert [55] werden. In einzelnen Fällen wie bei Lysozymen [56] oder der Myokinase des Skelettmuskels [57] bringt aber das Erhitzen auf Siedetemperatur eine erhebliche Anreicherung ohne Schädigung des Fermentes. Beim Erhitzen des Extraktes für 2 Min. wurden die Aktivitäten unterhalb 50° C überhaupt nicht beeinflußt und bei 60° C fiel die Kurve nur schwach ab (Tabelle 5). 16 Minuten langes Erwärmen auf 50° C brachte keine nachweisbare Aktivitätseinbuße, aber im Extrakt bildete sich ein inaktiver Niederschlag. Daher wurden alle Aufarbeitungen mit einer 15minütigen Erwärmung des Extraktes auf 50° C begonnen.

Durch Aneinanderreihen der beschriebenen Anreicherungsstufen wurde eine wäßrige Enzymfraktion erhalten, die nur noch 12-20 % des Extraktproteins enthielt und als Fraktion Mc zu Versuchen an modernen Ionenaustauschern und Molekularsieben eingesetzt wurde.
Die einzelnen Anreicherungsstufen nahmen für Acetokinase folgenden Verlauf:

Extrakt	35	µ Mol $AcPLi_2$/g Protein · Stde.
erhitzter Extrakt	46	" "
$(NH_4)_2SO_4$ 20 - 48 g/V%	106	" "
Aceton 33 - 50 %	274	" "
Fraktion Mc	578	" "

Fliegenacetokinase konnte bisher mit einer spezifischen Aktivität von 2500 µMol $AcPLi_2$/g Protein · Stde. erhalten werden [13].

b) Versuche an Ionenaustauschern

Nach F. T u r b a [58] empfiehlt es sich, vor Anwendung der Ionenaustauschmethoden Reinigungsschritte durch Aussalzen, Fällen mit Lösungsmitteln, selektive Denaturierung durch Hitze usw. vorwegzunehmen. Diese Forderung haben wir bei den Versuchen immer beibehalten. Da die chromatographischen Methoden zu den Anreicherungsversuchen zeitlich parallel liefen, wurden verschieden angereicherte Fraktionen dafür verwendet. Die Ergebnisse der Ionenaustauschversuche änderten sich jedoch qualitativ nicht.

Den Ionenaustauschern auf der Basis vernetzter Dextrane [59] wurden für die Proteintrennung besonders günstige Eigenschaften zugeschrieben [60]. Diese wurden in Form des Diäthylaminoäthyl-Sephadex (DEAE-Sephadex) 1961 erstmals von J. P o r a t h und E. B. L i n d n e r [61] als Ionenaustauscher zur Trennung von Ocytocin und Vasopressin verwendet. Da u. a. auch Acetokinase und Phosphotransacetylase der Hefe mit DEAE-Sephadex angereichert wurde [15], führten wir unsere ersten Versuche ebenfalls mit DEAE-Sephadex durch.

Vorversuche wurden auf einem Büchnertrichter [15] durchgeführt (Tabelle 22, S. 70). Diese Methode gleicht mehr dem diskontinuierlichen Verfahren [62], bei dem der Austauscher im ganzen mit der

Elutionsflüssigkeit ins Gleichgewicht gebracht wird, als einer Säule. Erst bei Verwendung einer Säule und durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration konnten die drei Aktivitäten der Cholinacetylase, Phosphotransacetylase und Acetokinase nacheinander eluiert werden. Die Gipfel lagen aber so dicht, daß eine präparative Trennung nicht möglich war (Abbildungen 5 + 6, S. 71/72). Eine Vergrößerung der Sephadex-Menge von 0,5 auf 2 g ergab das gleiche Bild unter geringfügiger Verschiebung der Gipfel zu höheren Salzkonzentrationen. Die Aktivitätskurve der Phosphotransacetylase zeigte eine Schulter, die mit dem Maximum der Acetokinaseaktivität zusammenfiel, was vermuten läßt, daß zwei Enzyme mit gleichen Eigenschaften vorlagen. Versuche mit Veränderungen des p_H-Wertes führten zu keinem Erfolg (Tab. 23, S. 71).

Versuche mit den sauren Austauschertypen Carboxymethyl-Sephadex (CM-Sephadex) [59] und Sulfoäthyl-Sephadex (SE-Sephadex) [59] zeigten, daß die Enzyme zum Austauscher nur wenig oder wie bei SE-Sephadex überhaupt keine Affinität haben (Tabellen 24-26, S. 74-76). Die geringe bis fehlende Adsorbierbarkeit saurer Austauscher läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß die Titrationskurve im Bereich von p_H 3-11 außerordentlich steil ist [63] und man durch geringe p_H-Änderungen schon aus dem Bereich der Adsorbierbarkeit herauskommt. Mit niederen p_H-Werten konnte aber nicht gearbeitet werden, da nach den Erfahrungen der Säurefällung die Enzyme teilweise denaturiert werden. Es wurde auch ein Versuch mit Phosphorylcellulose [64] unternommen (Tabelle 27), da diese eine flachere Titrationskurve aufweist [65], doch kam es auch in diesem Falle zu keiner Adsorption.

Obwohl gerade an SE-Sephadex eine gemeinsame Anreicherung aller Enzyme durch das alleinige Filtrieren über den Austauscher zu verzeichnen war, wurden die Versuche nicht weiter verfolgt, da sie für die angestrebte Trennung keinen Erfolg versprachen.

Am Anionenaustauscher wurde versucht, die Elutionsbedingungen zu vari-

ieren und durch eine Erhöhung der Austauschermenge bessere Trennungen zu erhalten. Die eluierten Aktivitäten waren jedoch ungewöhnlich niedrig. Da das Eluat sehr stark alkalisch war, wurden die Enzyme wahrscheinlich durch die hohe p_H-Verschiebung zerstört (Abbildung 8, S. 77).

Um das stufenweise Steigern der Ionenkonzentration zu umgehen, wurde ein Gradientenmischer nach Angaben von K. D o r f n e r [66] gebaut, der einen linearen Gradienten lieferte. Jedoch wanderten bei einem kontinuierlichen Ansteigen der Ionenkonzentrationen die Aktivitätsmaxima wieder enger zusammen (Tabelle 9).

Nachdem auch ein Versuch mit DEAE-Cellulose [64] das gleiche Bild ergab wie mit DEAE-Sephadex (Abb. 5 u. 14), kann man folgendes zusammenfassen: Der Ladungscharakter der drei Enzymproteine muß sehr ähnlich sein. Auch die aus verschiedenen Ammonsulfat-Fraktionen gewonnenen Enzyme verhalten sich am Ionenaustauscher gleich (Abbildung 8). Ihre gute Adsorbierbarkeit an Anionenaustauschern läßt auf das Überwiegen von sauren Gruppen schließen. Die Extinktionen der eluierten Fraktionen bei 280 mμ sind sehr niedrig. Sie entsprechen etwa einem Proteingehalt von 5-10 γ/ml.

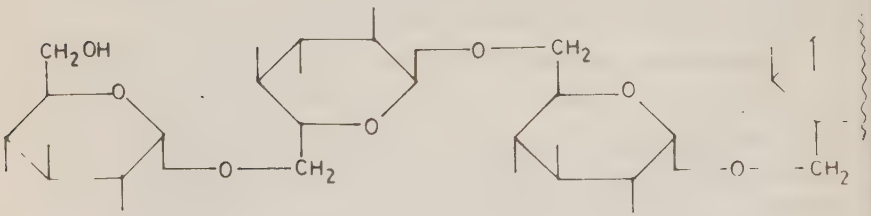
c) Versuche an Molekularsieben

α) Theorie der Molekularsiebe:

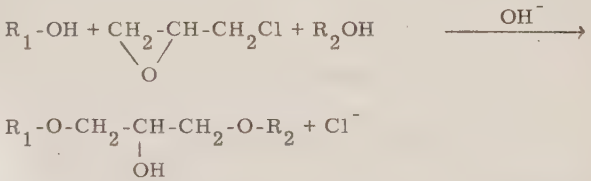
Molekularsiebe im weitesten Sinne sind Substanzen, die Moleküle oder Ionen bestimmter Größe einschließen können. Die ältesten, schon im Altertum bekannten Molekularsiebe sind Mineralien wie z. B. Zeolithe [67].

Die unübersichtlichen Verhältnisse an natürlichen Mineralstoffen führte zu Versuchen, Molekularsiebe auf synthetischem Wege herzustellen. So kam man zu Stoffen definierter Zusammensetzung und definierter Eigenschaften. Für die Biochemie bekamen Molekularsiebe erst Bedeutung, als J. P o r a t h und P. F l o d i n [68] ihr vernetztes Dextran unter dem Namen Sephadex [59] vorstellten.

Dextran ist ein aus D-Glukose aufgebautes, ganz überwiegend



α-1.6-verknüpftes Polysaccharid [69]. Es wird durch Einwirkung des Bakteriums Leuconostoc mesenteroides auf Rohrzucker gebildet und auch technisch so dargestellt. Um das Molekulargewicht zur Weiterverarbeitung auf eine bestimmte Größe herabzusetzen, wird Dextran mit Säure teilweise hydrolysiert.+) Als Vernetzungsmittel dient Epichlorhydrin [70].



+) Fraktionen mit Molekulargewichten um 80 000 werden als Blutersatzmittel verwendet.

Durch verschiedene Vernetzungsgrade lassen sich Gel-Partikel verschiedener Porenweite darstellen, so daß der Siebeffekt jedem Problem angepaßt werden kann. Zur Zeit sind Sephadex-Typen im Handel, die Ausschlußgrenzen zwischen Molekulargewichten von 200 000 bis 700 besitzen. Drei Jahre nach der Sephadex-Synthese stellten D. J. Lea und A. H. Sehon [71] ein vernetztes Polyacrylamid her, das unter dem Namen Bio-Gel [72] im Handel ist. Dieses Material soll den Vorteil haben, daß es nicht von Bakterien angegriffen wird. Es besitzt einen Ausschlußbereich zwischen Molekulargewichten von 300 000 bis 1600. H.G. Boman und S. Hjerten [73] stellten in einer Arbeit über Bakterien-Ribonukleinsäuren fest, daß beide Erzeugnisse als gleichwertig zu betrachten sind. Sephadex hat einen sehr weiten Anwendungsbereich [70, 73]. Es läßt sich zum Entsalzen [68], oder zum Überführen von Proteinen in einen anderen Puffer [70], zum Konzentrieren von Proteinlösungen [75], zum Fraktionieren von Proteinen nach dem Molekulargewicht auf Chromatographiesäulen [76], zur Molekulargewichtsbestimmung [77, 78] und zur Dünnschichtchromatographie [79] sowie Elektrophorese [80] verwenden.

Die größte Bedeutung hat das Molekularsieb in der Säulenchromatographie. Bei dieser sogenannten Gel-Filtration [68] können Moleküle entsprechend der Vernetzung, also der Porenweite, entweder in das Innere der Gelpartikel eindringen oder ausgeschlossen werden. Dabei handelt es sich um Diffusionsvorgänge, so daß man für einen bestimmten Stoff einen Verteilungskoeffizienten K_d [70] definieren kann. Dieser läßt sich nach P. Flodin [70] entsprechend folgender Formel bestimmen:

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i$$

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

V_e = Elutionsvolumen

V_i = inneres Volumen der Gelpartikel

V_o = äußeres Volumen zwischen den Gelpartikeln

Damit gibt der K_d-Wert den Bruchteil des inneren Volumens an, der von den Molekülen aufgesucht werden kann. Er liegt definitionsgemäß zwischen 0 und 1. Ist der K_d-Wert größer als 1, so muß man annehmen, daß auch Adsorptionsprozesse Einfluß haben. Der K_d-Wert ist vergleichbar mit dem R_f-Wert der Papier- und Dünnschichtchromatographie. In der Säulen- und Gaschromatographie ist es üblich, die Leistung einer Säule nach theoretischen Böden zu bemessen. P. F l o d i n [70, 82] hat die dortigen Verhältnisse auf die Sephadex-Säule übertragen und für verschiedene Sephadex-Typen und für verschiedene Substanzen nach E. G l u e c k a u f [81] die Höhe der theoretischen Böden nach den Formeln

$$N = 8 \left(\frac{V_e}{ß} \right)^2 \qquad EHTP = \frac{l}{N}$$

berechnet.

N = Anzahl der Böden
V_e = Elutionsvolumen im Bandenmaximum
ß = Breite der Bande an der Stelle Gipfelmaximum : 2,72
EHTP = Höhe eines theoretischen Bodens (equivalent height of a theoretical plate)
l = Länge der Säule

Erwartungsgemäß findet P. F l o d i n mit steigender Durchflußgeschwindigkeit größere Bodenhöhen. Außerdem ist die Bodenhöhe der Partikelgröße proportional. Im übrigen stellt die Bodenhöhe bei sonst gleichbleibenden Bedingungen ein Maß für die Güte der aparativen Anordnung wie gleichmäßiges Strömen im Gelbett, Totvolumina als Vermischungszonen u. a. dar.

Für Bienenacetokinase wurde für unsere Versuchsanordnung eine Bodenhöhe nach dem Schema von P. F l o d i n mit 0,32 cm errechnet.

F l o d i n findet für Albumin 0,08 cm.

Da die Verteilung eines gelösten Stoffes auf der Sephadex-Säule von der Größe seines Moleküls abhängt, liegt es nahe, daß das Elutionsvolumen eine Funktion des Molekulargewichts (MG) ist. 1963 erschienen die ersten Arbeiten über die Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen von Th. W i e l a n d u. Mitarb. [77] und I.R. W h i t a k e r [78]. Während Th. W i e l a n d eine lineare Abhängigkeit der $\sqrt{MG}$ von $\sqrt[3]{K_d}$ fand, wies I.R. W h i t a k e r nach, daß in bestimmten Bereichen der log MG eine lineare Funktion des Quotienten aus dem Elutionsvolumen V_e und dem äußeren Volumen V_o ist. Da bei Verwendung derselben Säule V_o konstant bleibt, ergibt sich für den log MG eine direkte Beziehung zu V_e. Der lineare Arbeitsbereich liegt bei K_d-Werten, die größer als 0 und kleiner als 1 sind. Jede Säule muß zur Bestimmung des Molekulargewichts mit Proteinen bekannten Molekulargewichts geeicht werden.

ß) Konzentrierung von Enzymlösungen:

Für die chromatographische Trennung auf Sephadex sind konzentrierte Proteinlösungen notwendig. Von den verschiedenen Möglichkeiten wurde zunächst die Konzentrierung von Proteinlösungen mit Sephadex G-25 versucht. Die Ergebnisse waren aber nicht sehr zufriedenstellend. Zu der zu konzentrierenden Lösung wird eine bestimmte Menge trockenes Sephadex G-25 gegeben, das den Puffer aufsaugt und die großen Moleküle der Proteine ausschließt. Durch Zentrifugieren in einem Filtrationsbecher der Kühlzentrifuge soll die äußere Lösung mit den Proteinen abgetrennt werden. Dabei muß man darauf achten, daß nicht durch zuviel Sephadex die äußere Flüssigkeitsmenge so gering wird, daß sie sich nicht quantitativ entfernen läßt. Es ist sonst notwendig, mit Pufferlösung nachzuspülen, wodurch aber wieder die Proteinlösung verdünnt wird.

Eine weitere Möglichkeit der Konzentrierung besteht in der Dialyse gegen eine konzentrierte Lösung eines hochpolymeren Stoffes [83]. Wir verwendeten Polyvinylpyrrolidon (Luviskol K 90 [84]) in 20 proz. Lösung, die mit 0,1 n KOH neutralisiert worden war. In diese hochviskose Lösung wurde ein Dialysierschlauch mit der zu konzentrierenden Flüssigkeit gelegt und im Kühlschrank dialysiert. Nach mehreren Tagen war die Flüssigkeit eingeengt.

Eine schnelle Methode zur Konzentrierung ist die Fällung mit Ammonsulfat. Jedoch setzt Ammonsulfat beim Lösen Luft frei, die in feinen Bläschen aufsteigt und mit dem Protein einen stabilen Schaum bildet, der auch durch langes Zentrifugieren nicht zerstört werden kann. U. G e h r i n g [85] hat vergeblich versucht, die Luft auszuschließen. Ein weiteres Verfahren ist die Ultrafiltration durch proteindichte Membranen. U. G e h r i n g [85] filtriert aus geschlossenen Dialysierschläuchen durch Unterdruck im Wasserstrahlvakuum. Bei eigenen Versuchen platzten bei diesem Verfahren die verwendeten Dialysierschläuche.

Das gleiche Prinzip verwendet das Ultrafilter der LKB Produkter - AB . Ein Visking-Dialysierschlauch wird von einem Nylongerippe, das den Druck abfängt, gehalten und in die zu konzentrierende Lösung gestellt. Ein Wasserstrahlvakuum zieht die Pufferlösung nach innen. Der Dialysierschlauch soll für Molekulargewichte größer 30 000 undurchlässig sein.

γ) Chromatographische Versuche an Molekularsieben:

Die Versuche zur Trennung der Bienenenzyme begann mit Säulen von ca. 50 cm Länge an Sephadex G-100 Ausschlußgrenze MG = 100 000 . Es erschienen im Uvicord zwei Gipfel, von denen der erste nicht aktives Protein, der zweite alle Aktivitäten enthielt (Abbildung 10). Bei

einer Wiederholung dieses Versuchs und exakter Testung aller Fraktionen zeigte sich, daß das Maximum der Acetokinase nur wenig den gemeinsamen Maxima der übrigen Aktivitäten vorauslief. Eine Chromatographie an Sephadex G-200 (Ausschlußgrenze MG = 200 000) ergab, daß auch hier nur die Aktivität der Acetokinase etwas früher eluiert wurde (Abbildung 13). Da die Fließgeschwindigkeit in Sephadex G-200-Säulen bei der absteigenden Chromatographie sehr gering ist, wurden die weiteren Versuche mit längeren Säulen nur mit Sephadex G-100 vorgenommen.

In einer 1 m-Säule konnte man erkennen, daß nach dem ersten inaktiven Gipfel der Proteinabsorptionskurve im Minimum eine Phosphotransacetylase eluiert wurde, an die sich im Anstieg des zweiten Gipfels die Acetokinase und im zweiten Gipfel selbst die ungetrennten Aktivitäten der Cholinacetylase und einer weiteren Phosphotransacetylase anschlossen (Abbildung 11). Durch Einengung von drei bestimmten Fraktionen, in welchen sich die Maxima der drei vorgetrennten Aktivitäten aus drei Versuchen befanden, und durch erneute Chromatographie konnte aus der Fraktion I die erste Phosphotransacetylase (Phosphotransacetylase I) verhältnismäßig gut von den anderen Enzymen abgetrennt werden (Abb. 12). Aus Fraktion II wurde Acetokinase nur unter Verlust isoliert, da große Mengen Acetokinaseaktivität bei den untrennbaren, letzten beiden Enzymen der Fraktion III mitliefen. Aus der Fraktion III konnte nur eine Fraktion Phosphotransacetylase II + Cholinacetylase erhalten werden, die noch Acetokinase enthielt. Die Hoffnung, daß bei einer Arbeitstemperatur von $4^{\circ}C$ im Kühlraum die Banden schärfer würden und damit die Trennung besser, konnte nicht verifiziert werden.

Da Cholinacetylase und Phosphotransacetylase immer nur mit Hilfe eines zweiten Enzyms über die Acetylcholinsynthese aus AcP nachgewiesen wurden, und mit zunehmender Trennung die Ausbeute an AcCh notwendigerweise abnehmen mußte, da das eigene Zubringer-

enzym fehlte, lassen sich keine exakten Angaben über die Anreicherung machen. Die Anreicherung der Acetokinase läßt sich dagegen besser übersehen.

Der Extrakt synthetisierte gewöhnlich 34,6 µMol $AcPLi_2$ / g Protein · Stde (hier war auch noch ein Einfluß von Myokinase möglich). Der Versuch an DEAE-Cellulose brachte für Acetokinase eine Erhöhung der Aktivität auf 190 µMol $AcPLi_2$/g Protein · Stde., die DEAE-Sephadex-Trennung eine solche auf 470 µMol $AcPLi_2$/g Protein · Stde. Am besten waren die Ergebnisse bei der zweifachen Trennung auf Sephadex G-100 (Gesamtsäulenlänge 174 cm) mit 2700 µMol $AcPLi_2$/g Protein · Stde. Verglichen mit dem Extrakt ist das eine Anreicherung von 1 : 80.

Zum Vergleich hierzu seien einige Werte aus der Literatur angegeben: Fliegenacetokinase synthetisiert $2,5 \cdot 10^3$ µMol [14], Acetokinase aus Streptobakterium plantarum 10S $25,2 \cdot 10^3$ µMol [45] und Acetokinase aus E.coli $18,0 \cdot 10^6$ µMol/g Protein · Stde. [30].

Weitere Kennzahlen für Enzymproteine sind die K_d-Werte, die für eine bestimmte Sephadex-Säule errechnet werden.

Für die Bienenenzyme konnten folgende K_d-Werte auf einer G-100-Säule errechnet werden:

Phosphotransacetylase I	0,12
Acetokinase	0,18
Cholinacetylase und Phosphotransacetylase II	0,23

Säule: Sephadex G-100 2,1 x 84 cm

Durchflußgeschwindigkeit: 36 ml/Stde. = 9,5 ml/Stde. · cm^2.

Durch Vergleich dieser K_d-Werte mit bekannten Arbeiten [78] kann sehr grob geschätzt werden, daß Bienenacetokinase ein Molekulargewicht von etwa 50 000 zukommt. Das Molekulargewicht von Cholinacetylase und das von Phosphotransacetylase II dürfte etwas niedriger liegen, das von Phosphotransacetylase I etwas höher.

δ) "Zone Precipitation" :

J. P o r a t h [86] entwickelte 1962 eine kontinuierliche Ammonsulfatfällung auf der Sephadex-Säule, die er "Zone Precipitation" nannte. Die Methode beruht auf der Möglichkeit, Protein auf der Säule mit Ammonsulfat niederzuschlagen und mit einem negativen Ammonsulfatgradienten, d. h. mit fallenden Ammonsulfatkonzentrationen, kontinuierlich zu eluieren. Da Cholinacetylase und Phosphotransacetylase der Fliege durch Ammonsulfatfällung getrennt werden können [13], wurde mit diesen Enzymen ein Modellversuch gemacht. Die klassische Methode der Fällung zeigte sich hier jedoch der kontinuierlichen Elution überlegen, obwohl eine Trennung ersichtlich war (Abbildung 15, S. 86). In einem Versuch mit Bienenenzymen erhielten wir alle Aktivitäten im gleichen Gipfel (Abbildung 16, 17, S. 86, 87).

D) Versuche mit gereinigten Enzymen

a) Acetokinase

Die aus verschiedenen Versuchen angereicherte Acetokinase der Biene zeigte eine ausgeprägte Spezifität für Acetat-Ionen und ein Bedürfnis für Mangan- oder Magnesium-Ionen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen bei Bakterien[45, 87] überein. Setzt man die Aktivität mit Acetat gleich 1, so wird sie mit Propionat 0, 23, mit Laktat 0, 18 und mit Butyrat 0, 12 (Tabelle 31, S. 89)
Bei E. coli wird ein Verhältnis für Acetat-/Propionat-Aktivierung wie 1/0, 1 angegeben[87].

Außer Mn^{++} und Mg^{++} haben andere Kationen wie K^{+}, Na^{+}, NH_4^{+}, Ca^{++}, Zn^{++} und Cd^{++} weder positive noch negative Einflüsse (Tabelle 29/30). Mit Mn^{++} wird die Aktivität gegenüber Mg^{++} etwa verdoppelt (Tabelle 28). Dieses überraschende Ergebnis stimmt mit dem Befund[15] bei der Hefe überein. Dagegen wurde es nicht bei Bakterien beobachtet[45, 87], bei denen die katalytischen Wirkungen etwa gleich waren. Mit dem Logarithmus der steigenden Mangan-Konzentration nimmt die AcP-Synthese linear zu, bis ein Mol. Mangan einem Mol. eingesetztem ATP entspricht. Dann wird die AcP-Synthese von der Mangan-Konzentration unabhängig (Tabelle 28, S. 88).

Arsenat und Arsenit haben keinen Einfluß auf die Reaktion, so daß man annehmen kann, daß im aktiven Zentrum keine Sulfhydrylgruppen an der Umsetzung teilnehmen (Tabelle 32, S. 89).

Das p_H-Optimum, das zur alkalischen Seite steil abfällt, liegt bei 6, 8 (Abbildung 18, S. 90). I. A. R o s e[30] findet für die Acetokinase von E. coli ein Maximum bei p_H 7, 4 und grenzt den optimalen p_H-Bereich der Aktivität von 6, 5 bis 7, 8 ein. Unser Enzym hat dagegen bei p_H 5, 9 noch 50 % seiner Aktivität und ist bei p_H 7, 2 schon auf 60 % gesunken.

Die Bildung von AcP wurde nur indirekt mit der Hydroxamsäure-reaktion zu Acethydroxamsäure nachgewiesen. Zur Untermauerung der Behauptung, daß es sich um die Bildung von AcP aus ATP handelt, wurde die Rückreaktion vom AcP mit ADP zum ATP untersucht. Dabei wurde die Abnahme der AcP-Konzentration bei ADP-Gegenwart gemessen. Es zeigte sich, daß sich ein Gleichgewicht nach 4,5 Stdn. eingestellt hatte, nachdem etwa 1/3 der eingesetzten ADP zu ATP geworden war. Die Zeitkurve der AcP-Bildung aus ATP dagegen verlief bis zum vollkommenen Verbrauch des ATP (Tabelle 33, 34, S. 90, 91), da AcP sofort nach der Entstehung in die Hydroxamsäure übergeführt und das Gleichgewicht vom ATP ganz auf die rechte Seite verschoben wird. In vivo würde dieser Schritt durch Phosphotransacetylase vorgenommen, indem aus AcP das AcCoA gebildet würde.

b) Die Michaelis-Menten-Konstante [88, 89, 90]

Für den einfachen Fall, daß ein Substrat durch ein Enzym hydrolysiert wird, kann man nach L. Michaelis und M.L. Menten [90] annehmen, daß folgende Gleichungen gelten:
Als erster Schritt wird die Bildung einer Enzym-Substrat-Verbindung angenommen:

(1) $\underset{(e\text{-}p)}{E} + \underset{(x)}{S} \longleftrightarrow \underset{(p)}{ES}$

E = Enzym
S = Substrat
ES = Enzym-Substrat-Komplex

Bei oder nach der Hydrolyse werden die Spaltprodukte vom Enzym wieder abgelöst:

(2) $\underset{(p)}{ES} + H_2O \longleftrightarrow E + P + Q$

P und Q sind die Reaktionsprodukte.

Für die Gleichgewichtsreaktion (1) gilt nach dem Massenwirkungsgesetz:

$V_{\rightarrow} = x\,(e-p) \cdot K_1$ $\quad V_{\rightarrow}$ = Reaktionsgeschwindigkeit der Hin-Reaktion

$V_{\leftarrow} = p \cdot K_2$ $\quad V_{\leftarrow}$ = Reaktionsgeschwindigkeit der Rück-Reaktion

$$pK_2 = x\,(e-p) \cdot K_1$$

$$(3) \qquad \frac{x\,(e-p)}{p} = \frac{K_2}{K_1} = K_m$$

Die einzige Größe, die in dieser Gleichung normalerweise bekannt ist, ist die Substratkonzentration x (in Mol) und vielleicht $V_{\rightarrow}$ oder $V_{\leftarrow}$. Nimmt man an, daß die Umsatzgeschwindigkeit v anfangs gleich $V_{\rightarrow}$ und abhängig von der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ist, so wird

$$(4) \qquad v = K \cdot p$$

(4) in (3) eingesetzt, führt zu

$$\frac{x\,\left(e - \frac{v}{K}\right)}{\frac{v}{K}} = K_m$$

$$(5) \qquad \frac{x\,(e \cdot K - v)}{v} = K_m$$

Nimmt man den Fall an, daß die Substratkonzentration x sehr viel größer ist als die gesamte Enzymkonzentration e, so kann man postulieren, daß es kein freies Enzym gibt, sondern nur die Substratverbindung p, deren Konzentration gleich e ist. Dabei muß v einen Maximalwert v_{max} annehmen.

$$(6) \qquad v_{max} = K \cdot e$$

Durch Einsetzen von (6) in (5) erhält man die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{x\,(v_{max} - v)}{v} = K_m$$

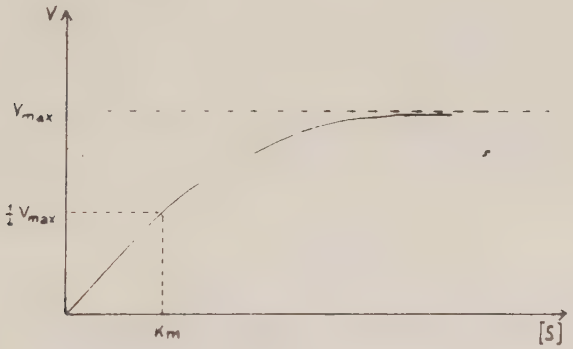
Durch Auflösen nach v wird erhalten:

$$x \cdot v_{max} - v \cdot x = K_m \cdot v$$

$$v\,(x + K_m) = x \cdot v_{max}$$

(7) $$v = \frac{x \cdot v_{max}}{x + K_m}$$

Die Kurve stellt den Ast einer rektangulären Hyperbel dar.



Für $x = K_m$ ist $v = 1/2\ v_{max}$

Um die Michaelis-Menten-Konstante K_m aus der Kurve bestimmen zu können, müßte man $1/2\ v_{max}$ interpolieren. Da dies auf einer Geraden einfacher ist als auf einer Hyperbel, wird die Michaelis-Menten-Gleichung (7) umgeformt:

(8) $$\frac{1}{v} = \frac{K_m + x}{x \cdot v_{max}} = \frac{K_m}{x \cdot v_{max}} + \frac{x}{x \cdot v_{max}}$$

(9) $$\frac{1}{v} = \frac{1}{x} \cdot \frac{Km}{v_{max}} + \frac{1}{v_{max}}$$

Die neu gewonnene Gleichung stellt graphisch eine Gerade dar der allgemeinen Gleichung $y = az + b$, in der $y = 1/v$ und $z = 1/x$ die veränderlichen Größen und $a = Km/v_{max}$ und $b = 1/v_{max}$ die Konstanten darstellen. Für $z = 1/x = O$ erhält man als Schnittpunkt mit der y-Achse $y = b = 1/v_{max}$; für $y = 1/v = O$ erhält man als Schnittpunkt mit der x-Achse, $az = -b$; $z = -\frac{b}{a}$;

$$\frac{1}{x} = - \frac{1 \cdot v_{max}}{v_{max} \cdot Km}$$

$$= - \frac{1}{Km}$$

Dadurch lassen sich die Konstanten der Michaelis-Gleichung als Schnittpunkte von Geraden exakt bestimmen.

Bei vielen Enzymen wird die Aktivität durch sehr viel Substrat gehemmt. Für diesen Fall ist eine noch weiter gehende Umformung nötig [89].

Multipliziert man die Gleichung (8) auf beiden Seiten mit x, so erhält man:

(10) $$\frac{x}{v} = \frac{Km + x}{v_{max}}$$

Wird nun x/v gegen x abgetragen, so ergibt sich daraus zwar keine Gerade, aber eine Hyperbel mit einem Schnittpunkt mit der y-Achse, aus der sich die gesuchten Daten folgendermaßen extrapolieren lassen.

In einer anderen Schreibweise von Gleichung (10) ersieht man, daß der Schnittpunkt mit der y-Achse Km/v_{max} ist:

$$\frac{x}{v} = \frac{x}{v_{max}} + \frac{Km}{v_{max}}$$

(11) $$y = \frac{1}{v_{max}} \cdot x + \frac{Km}{v_{max}}$$

Durch Differenzieren von (11) ergibt sich

$$y' = \frac{1}{v_{max}}$$

Die Steigerung im Ordinatenschnittpunkt ist somit der reziproke Wert der theoretischen (nicht tatsächlichen) Maximalgeschwindigkeit bei sehr hoher Substratkonzentration. Für den gesuchten Wert Km setzt man in Gleichung (11) $x = O$ und erhält $Km = y \cdot v_{max}$. Es wird der Schnittpunkt der Hyperbel mit der y-Achse mit v_{max} multipliziert. Diese Darstellung von Km stellt als Extrapolationsverfahren nur eine Schätzung dar, aber wird häufig angewendet. Die Angabe von Km zur alleinigen Beschreibung der Enzymaktivität muß jedoch kritisch betrachtet werden. Die Ableitung von Km nach M i c h a e l i s und M e n t e n beruht auf der vereinfachenden Annahme, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt einer Enzymreaktion in der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes liegt. Daher spricht man von Km auch als Dissoziationskonstanten. Man darf aber nicht immer damit rechnen, daß die Anheftung des Substrats an das Enzym gleichbedeutend ist mit der Reaktion des Substrats zum Produkt. Es könnte ebenso die Substratumwandlung einen weiteren geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen.

Ferner versagt diese Vorstellung bei Umsetzungen, die zwei oder gar mehrere Substrate benötigen. Für den Fall der Acetokinase braucht man zur vollständigen Beschreibung für ATP und Acetat je eine Konstante für den Fall des freien Enzyms und erneut zwei Konstanten für den Fall, daß das Enzym schon einen Reaktionspartner gebunden hat. Ferner könnte man eine Konstante berechnen für die Umsetzung am Enzym, und zur Ablösung der zwei Reaktionsprodukte ADP und AcP kommen wieder vier Konstanten zum Tragen, so daß der gesamte Schritt aus neun Gleichgewichtskonstanten resultiert [91]. Erschwerend kommt hinzu, daß die Reaktion des Hydroxylamins mit dem AcP geschwindigkeitsbestimmend für den Loslösungsschritt des AcP vom Enzym sein kann. Da aber immer die Anfangsgeschwindigkeiten gemessen werden, spielt dieses Problem wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle.

In der Praxis läßt sich gewöhnlich nur eine Zu- oder Abnahme der Konzentration einer Verbindung messen. Aus den obigen Erwägungen gibt es daher Fälle, in welchen das Michaelis-Menten-Modell versagt und eine Bestimmung von Km unmöglich wird.
Die Michaelis-Menten-Konstante der Bienenacetokinase wurde für ATP bei 28°C mit $1{,}1 \cdot 10^{-3}$ Mol berechnet. I.A. R o s e [30] findet für E.coli $2 \cdot 10^{-3}$ bei 29°C (Tabelle 35, Abb. 19, 20, S. 91, 92).

c) Phosphotransacetylase

Da die Phosphotransacetylase I der Biene verhältnismäßig rein dargestellt werden konnte, wurden ihre Eigenschaften untersucht. 1 mg Protein synthetisierte mit Fliegencholinacetylase etwa 11 mg AcCh in 14 Stdn. Der Vergleichswert für den Extrakt lag etwa bei 10 γ AcCh pro mg Protein in 14 Stdn., wobei berücksichtigt werden muß, daß dieser noch zusätzliche Acetylphosphatase enthielt.

Eine direkte Bestimmung der Phosphotransacetylase ist die Messung von AcCoA nach E.R. S t a d t m a n n [11, 92]. CoA besitzt im U.V.-Bereich eine Absorptionskurve [93], die von 300 mμ aus ansteigt zu einem Maximum bei 260 mμ, bei 230 mμ ein Minimum besitzt und dann wieder steil ansteigt. Durch Acetylierung des CoA zum AcCoA wird das Minimum sehr stark angehoben. Die Änderung der Extinktion ist der Zunahme der AcCoA-Konzentration proportional [93]. Durch diesen glücklichen Umstand ist es möglich, die Enzymaktivität optisch zu verfolgen, ohne daß man in das System eingreifen muß. In eigenen Versuchen wurde mit Hilfe von Bakterienphosphotransacetylase [18] der Test erprobt und dann auf Bienenphosphotransacetylase übertragen (Abbildung 21, S. 94). Dabei fiel auf, daß im Gegensatz zu Bakterienphosphotransacetylase die langsamer reagierende Bienenphosphotrans-

acetylase I nach Zugabe des Ferments eine Accellerationszeit brauchte. Erst dann wird die gebildete Menge AcCoA der Reaktionszeit proportional. Zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit wurde daher die Steigung der Reaktionskurve gemessen.
Die Michaelis-Menten-Konstante der Phosphotransacetylase I betrug für CoA als Substrat $1,3 \cdot 10^{-4}$ Mol (Abb. 22-24). Für AcP als Substrat ließ sich die Konstante nicht bestimmen, da mit steigenden Konzentrationen des $AcPLi_2$ eine starke Hemmung auftrat. Diese dürfte auf Li^+-Ionen zurückzuführen sein. Da dies nicht eine normale Substrathemmung ist, ließ sich die Michaelis-Menten-Konstante auch nicht durch die Anwendung der Bestimmungsmethode nach H. Lineweaver und D. Burk [89] bei Substrathemmung anwenden.

d) Acetylcholin-Synthese

Die AcCh-Synthese aus AcP in angereicherten Fraktionen ist vom Zusatz reduzierender Agentien wie Cystein und Glutathion unabhängig (Tabelle 36, S. 98). Der Zusatz von Prostigmin zur Hemmung der Cholinesterase erbringt auch hier noch eine Steigerung der AcCh-Ausbeute um etwa 20 %, weil immer noch Spuren der hochaktiven Cholinesterase vorhanden sind. Durch Zugabe von Natriumacetat an Stelle von Kaliumacetat ergab sich eine Verminderung auf 50 % (Tabelle 36). Dieses Ergebnis wurde auch bei Fliegen [13] gefunden und erklärt sich dadurch, daß die Phosphataseaktivität durch Anwesenheit von Na^+-Ionen zunimmt, wodurch die konkurrierende Hydrolyse von AcP erhöht wird [14].
Mn^{++}-, Mg^{++}- und Ca^{++}-Ionen haben keinen Einfluß auf die AcCh-Synthese (Tabelle 37). Durch Zn^{++} wird die Ausbeute um ca. 80 %

gehemmt und durch Cd^{++}-Ionen um ca. 40 % erhöht; eine Erklärung dieser Befunde über das gegensätzliche Verhalten der beiden mit Sulfhydrylgruppen reagierenden Ionen steht noch aus. x)

Durch Arsenit wird die AcCh-Ausbeute sehr stark vermindert (Tab. 37). Daraus kann man wie bei den Fliegen [13] auf das Vorhandensein von Sulfhydrylgruppen bei der Phosphotransacetylase oder der Cholinacetylase schließen.

Arsenat hemmt die AcCh-Synthese in geringerem Umfang (Tabelle 37). Da keine Arsenolyse nachgewiesen werden konnte (Tabelle 38, S. 99), muß dieser Effekt wohl zum Teil durch die Reduktion von Arsenat zu Arsenit erklärt werden.

Diese Ergebnisse sind ebenfalls mit denen der Fliegen [13, 14] vergleichbar. Im übrigen werden Hemmungen durch Arsenat bei Enzymen nicht beobachtet [113].

E) Trennung von Milchsäurebakterien-Enzymen an Molekularsieben

Aus acetongetrockneten Milchsäurebakterien (Streptobakterium plantarum 10S) konnten früher durch Säurefällung zwei Fraktionen A_{10} und B_2 gewonnen werden, von denen die Fraktion A_{10} die Aktivitäten von Acetokinase, Myokinase und Phosphotransacetylase und die Fraktion B_2 die Aktivitäten Cholinacetylase und Phosphotransacetylase enthielten [45]. Die Phosphotransacetylasen der Fraktionen A_{10} und

x) Das p_H-Optimum der AcCh-Synthese im Extrakt liegt wenig ausgeprägt zwischen p_H 7, 8 und p_H 6, 6 (Tabelle 4).

B_2 zeigten Arsenolyse, wie sie schon verschiedentlich bei phosphattransferierenden Enzymen festgestellt worden war [19, 20, 11, 26]. Die Fraktion B_2 hatte sich als ein in der Papier-Elektrophorese und in der Tiselius-Elektrophorese einheitliches und untrennbares Gemisch von Phosphotransacetylase und Cholinacetylase erwiesen, so daß diese Fraktion als ein einheitliches Protein einer acetylcholinsynthetisierenden Transacetylase angesehen wurde [18]. Spätere Befunde [45] ließen dieses Ergebnis zweifelhaft erscheinen. Es sollte die Frage überprüft werden, ob mit der neu zugänglichen Methode der Trennung an Molekularsieben, der alte Befund bestätigt würde oder eine Trennung möglich wäre.

Ferner war das Verhalten der Arsenolyse-Aktivität bei der Trennung an Molekularsieben von besonderem Interesse. Bereits früher war beobachtet worden, daß die Phosphotransacetylasen der Fraktionen A_{10} und B_2 K^+-Ionen nur für die Arsenolyse-Reaktion und nicht für die Bildung von AcCoA aus AcP benötigten.

In Versuchen an Sephadex G-200 und G-100 mit Fraktion B_2 wurde überraschend deutlich, daß die Arsenolyse-Aktivität zwar mit der Phosphotransacetylase-Aktivität eluiert wurde, aber daß die Kurvenzüge der Aktivität nicht identisch waren. Während die Arsenolyse-Aktivität einen klar umgrenzten, scharfen Gipfel innerhalb der Phosphotransacetylase-Aktivität darstellte, war die Aktivität der Phosphotransacetylase sehr breit und offensichtlich durch Überlagerung mehrerer Maxima entstanden (Abbildungen 25 u. 26, S. 101). Der Abfall der Phosphotransacetylase-Aktivität fiel mit der scharf umrissenen Cholinacetylase-Aktivität zusammen.

Unter den gleichen Bedingungen geprüfte Fraktion A_{10} ließ bezüglich der Phosphotransacetylase-Aktivität und Arsenolyse-Aktivität das gleiche Bild erscheinen. Die Aktivität der Acetokinase lag mit der Arsenolyse-Aktivität zusammen, war aber frei von Myokinase-Aktivität (Abbildung 27). Auf Grund ihres niederen Molekulargewichts von

ca. 20 000 [94] erschien Myokinase erst nach vollkommener Elution der anderen Fermente.

Die von S.P. Colowick und H.M. Kalckar [16] für Muskelmyokinase beschriebene Thermostabilität konnte jedoch beim Bakterienenzym nicht bestätigt werden. Während die Autoren nach 10 minütigem Erhitzen auf 100°C noch ca. 80 % der Ausgangsaktivität fanden, war bei uns nach 5 Min. die Aktivität schon erloschen.

Das breite Band der Phosphotransacetylasen in Fraktion B_2 und A_{10} läßt erkennen, daß es sich um Isoenzyme handeln muß. Das Phänomen, daß ein biochemisch zunächst einheitlich erscheinendes Enzym sich in zwei Komponenten trennen ließ, wurde zuerst von J.B. Neilands [95] an der Rinderherz-Lactat-Dehydrogenase entdeckt und von Th. Wieland und G. Pfleiderer [96] im größeren Rahmen untersucht.

Unser Versuch beweist zwar noch nicht, daß Arsenolyse eine von der Phosphotransacetylase unabhängige Erscheinung ist, daß aber arsenolysefreie Isoenzyme der Phosphotransacetylase auch bei Bakterien existieren, wie es inzwischen ebenso für Clostridium acidiurici von S.M. Klein und R.D. Sagers [97] erstmals für Bakterien nachgewiesen wurde. Ein Vergleich der K^+-Ionen-Bedürftigkeit in den Fraktionen, welche durch Sephadex-Trennung aus Fraktion A_{10} gewonnen wurden, zeigt, daß alle Phosphotransacetylasen kein K^+ für die Bildung von AcCoA benötigen, während die Arsenolyse-Reaktion K^+-abhängig ist [18] (Abbildung 28, S. 103). Es müßte noch der Beweis erbracht werden, daß es sich um ein einheitliches Isoenzym-Spektrum handelt und die Arsenolyse einem anderen Ferment zuzuordnen ist. Dieses wäre dann eine Arsenatacetylase oder genauer eine Acetyl-CoA: Arsenat acetyltransferase.

In diesem Falle würde dann die Bakterienphosphotransacetylase den Phosphotransacetylasen von Hefe, Fliegen und Bienen gleichen.

Vergleiche der Fraktionen A_{10} und B_2 nach einer Sephadex-Filtration über dieselbe Säule zeigen für Phosphotransacetylase und für die Arsenolyse eine identische Aktivitätsverteilung (Abbildungen 26 u. 27). Die Aktivitäten der Fraktion A_{10} sind nur niedriger. Das beweist, daß bei der Säurefällung ein Teil der Aktivität mitfällt, die Hauptmenge aber in Lösung bleibt. Die oben erwähnte Vermutung [45], daß es sich um identische Phosphotransacetylasen handelt, konnte also bestätigt werden. Die Versuche lassen noch keine Aussage zu, ob die früher gefundene Acetylcholin-synthetisierende Transacetylase ein Gemisch einer Phosphotransacetylase und einer Cholinacetylase ist. Die erhaltenen Fraktionen mit Phosphotransacetylase und Cholinacetylase geben aber keine Arsenolysereaktion mehr (Abbildung 26).

F) Unterschiede von Bienen- und Fliegenenzymen

Da Fliegen und Bienen zum Insektenreich gehören, kann man einen Vergleich zwischen beiden bezüglich ihrer AcCh-bildenden Fermente anstellen. Wie diese Arbeit zeigt, konnten im zellfreien Extrakt die gleichen Enzymaktivitäten Acetokinase, Phosphotransacetylase- und Cholinacetylase- sowie Acetylphosphataseaktivität nachgewiesen werden. Desgleichen scheint die Biene wie die Fliege Acetthiokinaseaktivitäten zu enthalten [14, 46]. Da Bienen und Fliegen jedoch erhebliche morphologische und physiologische Unterschiede besitzen, und zudem ganz andere Lebensgewohnheiten haben, ist es nicht überraschend, daß die Eigenschaften der Enzyme sich voneinander unterscheiden.

Acetokinase wird im zellfreien Extrakt aus Acetontrockenpulver der Fliegen durch Säurefällung irreversibel denaturiert, während Cholinacetylase und Phosphotransacetylase unbeeinflußt bleiben. Diese konnten anschließend durch Ammonsulfatfällung voneinander getrennt werden [14]. Bei dem zellfreien Extrakt aus Acetontrockenpulver der Bienen wird Acetokinase durch Säuren nur partiell geschädigt, die beiden anderen Enzyme sind dagegen kaum noch nachweisbar (Tabelle 15). Durch Aceton- und Ammonsulfatfällung ließ sich bei den Fliegen die Acetokinase anreichern [14]. Alle diese herkömmlichen Methoden waren bei Bienen zur Trennung nicht erfolgreich, sondern führten nur zu einer gemeinsamen Anreicherung der Enzyme. Dabei konnte die Acetylphosphatase weitgehend durch Ammonsulfatfällung entfernt werden. Die Acetylphosphatase der Fliegen, die sich anfänglich nicht von der Phosphotransacetylase abtrennen ließ [13], konnte später durch Acetonfällung [14] weitgehend von Phosphatase befreit werden.

An DEAE-Sephadex konnten deutlich die drei Aktivitäten der Acetokinase, Phosphotransacetylase und Cholinacetylase nacheinander eluiert werden. Die Aktivitätsmaxima lagen aber so nahe, daß eine präparative Trennung nicht möglich war. Dabei zeigte der Verlauf der Phosphotransacetylase-Kurve eine Schulter.
An Sephadex G-100 wurden nacheinander eine Phosphotransacetylase, die Acetokinase und eine zweite Phosphotransacetylase, die mit Cholinacetylase zusammenlag, eluiert werden. Damit konnte ein gravierender Unterschied zwischen Bienen- und Fliegenenzym nachgewiesen werden. Eigene, vorläufige Versuche bei Fliegen zeigten bislang nur eine Phosphotransacetylase. Eine Erklärung dieses Phänomens kann noch nicht gegeben werden. Wir haben immer ganze Bienenvölker aufgearbeitet und nicht versucht, die Enzyme im Körper der Biene oder in Arbeiterbienen oder Drohnen gesondert zu lokalisieren.

Die beste Anreicherung von Fliegenacetokinase hatte eine spezifische Aktivität von 2,6 µMol AcP/mg Protein · Stde. ergeben [14].

Durch doppelte Chromatographie einer Bienenfraktion konnte die Bienenacetokinase bis zu einer spezifischen Aktivität von 2,7 µMol AcP/ mg Protein · Stde. angereichert werden. Phosphotransacetylase und Cholinacetylase wurden immer nur mit einem Hilfsenzym durch die Bildung von AcCh nachgewiesen, so daß ihre spezifische Aktivität nicht angegeben werden kann.

Die Bildung von AcCh aus AcCoA und Cholin ist praktisch irreversibel und bisher nur mit diesen Substraten gefunden worden. AcCoA kann dagegen auch aus anderen Quellen stammen. Diese Möglichkeiten wurden jedoch von uns nicht untersucht. Die Tatsache, daß das Gleichgewicht der Acetokinase auf seiten des ATP liegt, könnte vermuten lassen, daß dieses Ferment zur Bildung des Energiespeichers ATP dient und nicht zur Aktivierung von Acetat [15]. S.M. Klein und R.D. Sagers [98] nehmen das ebenso für Diplococcus glycinophilus an, indem sie einen Abbauweg des Glycins über AcCoA bis zum ATP nachweisen. Um diese Frage zu klären, müßte man Bienen mit markiertem Acetat füttern und dessen Schicksal im Körper verfolgen.

Experimenteller Teil

A) Analytische Methoden und Inkubationsbedingungen

a) Protein

α) Biuretreaktion:

Der Proteingehalt des Extraktes und der weniger stark angereicherten Fraktionen wurde mit der Biuretreaktion [35] durchgeführt. Für 17,6 mg Protein wurde eine Extinktion von 1,0 , bei 450 mμ, angenommen. Dieser Wert wurde früher [27] für Pferdeserum (Behringwerke, Marburg) gefunden und als innerer Laborstandard beibehalten.

Für höher angereicherte Fraktionen mit geringem Proteingehalt reichte die Empfindlichkeit des Biurettestes nicht mehr aus. Daher wurden Methoden nach L o w r y und Mitarb. [36], die Messung der U.V.-Absorption [37] oder die Messung der Fluoreszenz [41,42] überprüft.

ß) Methode nach L o w r y :

Die Methode nach L o w r y wurde nach D. G l ä s s e r u. R. K l e i n e [39] durchgeführt.

Reagenzlösungen:

a) 2,0 g Na_2CO_3 , 0,02 g K-Na-Tartrat , 100 ml 0,1 n NaOH ;

b) 5,0 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 100 ml H_2O ;

c) alkalische Kupfersulfatlösung: 50 ml a) + 1 ml b)

d) F o l i n - C i o c a l t e u 'sches Phenolreagenz [99]:

25,0 g Natriumwolframat ($Na_2WoO_4 \cdot 2\ H_2O$) und 6,25 g Natriummolybdat ($Na_2WoO_4 \cdot 2\ H_2O$) wurden in 175 ml H_2O in einem 500-

ml-Schliffkolben gelöst. Nach Zusatz von 12,5 ml 85 proz. Phosphorsäure und 25 ml 10n HCl wurde 10 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Dann gab man 3,75 g Lithiumsulfat gelöst in 12,5 ml H_2O und einige Tropfen Bromwasser zu und entfernte das überschüssige Brom durch 15 Min. Kochen. Nach dem Abkühlen wurde das Volumen auf 250 ml mit H_2O aufgefüllt. Hiervon wurde eine Probe von 1 ml mit 0,1 n KOH gegen Phenolphthalein als Indikator titriert und das Reagenz durch weiteres Verdünnen mit H_2O auf eine Acidität von 1 n Säure gebracht. Hierzu waren noch 200 ml H_2O nötig. Das fertige Reagenz wurde in einer braunen Flasche im Dunkeln aufbewahrt.

Ausführung: Zu 1 ml Proteinlösung gab man 5 ml frisch bereitete Lösung c) und nach 20 Min. 0,5 ml Lösung d). Nach weiteren 35-40 Min. wurde in einer 1-cm-Küvette bei 750 mμ die Extinktion gegen den Reagentienblindwert gemessen. Die Eichkurve wurde mit der angereicherten Bienenfraktion Ma (Abschnitt C. a. 2) durch Vergleich des Biurettestes mit der L o w r y - Methode erhalten. Für 0,88 mg Bienenprotein wurde eine Extinktion von 1,0 angenommen.

γ) U. V. -Absorption:

Die Messung der U. V. -Absorption [37] erfolgte in einer 1-cm-Quarzküvette bei 280 mμ. Die Eichkurve wurde mit der angereicherten Bienenfraktion Phosphotransacetylase I durch Vergleich der L o w r y-Methode mit der U. V. -Absorption erhalten. Für 0,74 mg Bienenprotein wurde eine Extinktion von 1,0 für die 1-cm-Quarzküvette angenommen. Für die 0,3-cm-Quarzdurchflußküvette des Uvicords errechnete sich daraus für 3,6 mg Protein eine Extinktion von 1,0.

δ) Fluoreszenzmethode:

Zur Bestimmung des Proteingehalts nach V.G. Shore u. A.B. Pardee [41,42] mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie wurde die Proteinlösung in eine 1-cm-Quarzküvette gebracht und die Fluoreszenzausbeute bei senkrechter Stellung der Küvette in einem Spektralfluorometer der Firma CARL ZEISS, Oberkochen, gemessen. Das Gerät bestand aus dem mit 25 A gespeisten Xenonhochdruckbrenner XBO 501 der Firma OSRAM als Lichtquelle. Das Licht fiel ohne U.V. Filter durch eine mit Wasser gekühlte Küvette zum Schutz des Monochromators. Der Monochromator M_4Q II gab das Licht in das Küvettengehäuse. Die Fluoreszenzstrahlung trat durch den Boden der Küvette aus, wurde in den zweiten Monochromator gleichen Typs gespiegelt und daraus in den Elektronenvervielfacher RCA 1P28 überführt. Als Anzeigegerät diente ein PMQ II. Eingestrahlt wurde Licht mit $295 \pm 6,5$ mμ, das Fluoreszenzlicht von 345 mμ (Spaltbreite 2 mm) wurde gemessen. Als Standard diente eine Verdünnung von LAB-TROL [40,101], No LT-25 XD, welches auf $7,0 \pm 0,2$ g / 100 ml eingestellt war. Die Verdünnung enthielt 70γ Protein pro ml, wurde mit Phenylquecksilberacetat (1 : 50 000) konserviert und war über ein Jahr im Kühlschrank haltbar. Der Ausschlag des Standards betrug 150 Skalenteile bei voller Verstärkung des Anzeigegerätes. Die Werte wurden korrigiert nach Angaben von O. Dann und P. Nickel [100].

Zur Bestimmung des Maximums wurde eine Fluoreszenz-Intensitätskurve von LAB-TROL aufgenommen. Diese zeigte verglichen mit Bienenextrakt (I), angereicherten Fraktionen (II) und über Sephadex gereinigte Fraktionen (III) einige Unterschiede (siehe Abbildung 2 auf der folgenden Seite). Verdünnungsreihen gaben bis zu 0,1 mg Protein pro ml eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration und der Intensität der Fluoreszenzstrahlung (Abbildung 3).

Die verwendeten Salzlösungen stören die Bestimmung nicht:

	Intensität [Skalenteile]
Phosphatpufferlösung (C. a. ß.)	0, 5
Phosphatpufferlösung + 70γ Protein	145
Extraktionslösung (B. a. γ.) + 70γ Protein	145

Die Bestimmung erfolgt mit der erwähnten Standardlösung.

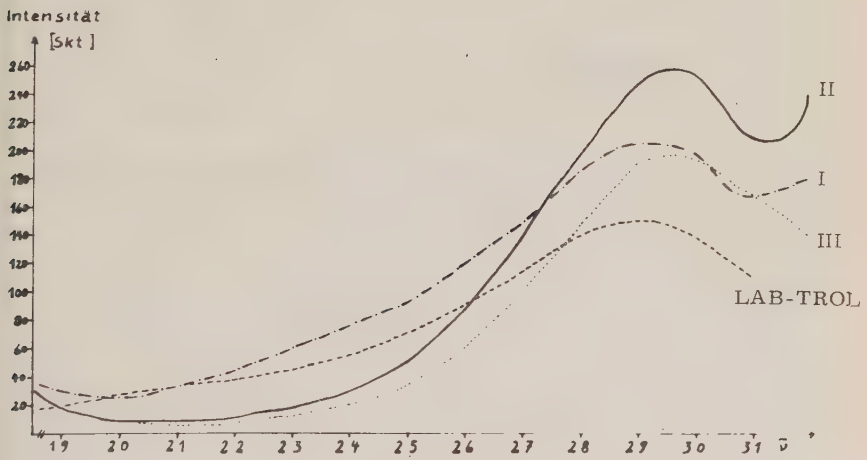


Abbildung 2

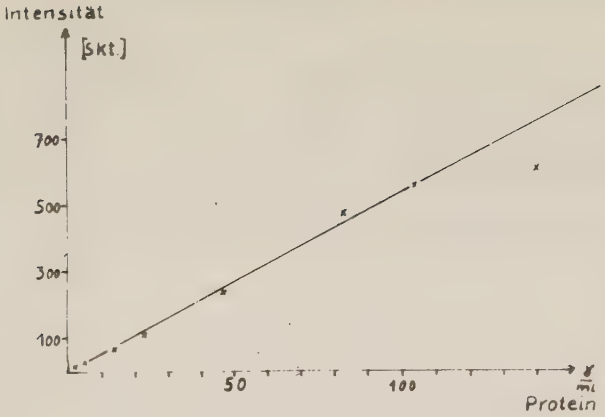


Abb. 3

b) Acetylphosphat

α) Bestimmung von Acetylphosphat:

Aus den 2-ml-Inkubationsansätzen wurde jeweils 1 ml entnommen und versetzt mit 0,5 ml Hydroxylaminlösung (28 %g/V $NH_2OH \cdot HCl$), 0,5 ml NaOH-Lösung (14 %g/V) und 1 ml Acetatpufferlösung (6,0 g Essigsäure, 13,6 g Natriumacetat in 100 ml H_2O). Nach 10 Min. wurden 3 ml eines Gemisches von 1 ml 2,5 n HCl, 1 ml Eisen-III-Chlorid (5 %g/V $FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$ in 0,1 n HCl) und 1 ml Trichloressigsäurelösung (12 %g/V) zugesetzt und die entstandene Rotfärbung im Spektralphotometer M_4Q der Firma CARL ZEISS, Oberkochen, bei 540 mμ in Glasküvetten, Schichtdicke 2 cm, gemessen. Für 1 mMol $AcPLi_2$ (≙ 178γ) wurde eine Extinktion von 0,241 angenommen.

ß) Entfernen von Acetylphosphat im Acetokinasetest:

Zum Entfernen des Acetylphosphats in der Acetokinasereaktion wurde dem Ansatz wie unter A. d. ß. angegeben Hydroxylamin vor der Inkubation zugegeben. Nach der Inkubation wurden dem 2-ml-Ansatz .4 ml einer Mischung von 1 ml 2,5 n HCl, 1 ml Eisen-III-Chlorid-Lösung,

1 ml Trichloressigsäurelösung und 1 ml H_2O zugesetzt und die gebildete Acethydroxamsäure analog der Bestimmung von Acetylphosphat gemessen. Als Blindwert diente ein Röhrchen ohne Acetokinaseaktivität oder ohne ATP.

c) Acetylcholin

α) Biologische Methode:

Im zellfreien Extrakt und in den weniger angereicherten Fraktionen, sowie zum Vergleich mit chemischen Methoden, wurden die AcCh-Ausbeuten mit dem sensibilisierten Blutegelrückenmuskel nach F ü h n e r [31] gemessen. Um ein möglichst gleichmäßig reagierendes Material zur Verfügung zu haben, wurden Blutegel (Hirudo officinalis) [102] verwendet, welche in 5-l-Steinguttöpfen in 3 l destilliertem Wasser, versetzt mit ca. 50 ml Ringerlösung, bei Zimmertemperatur mindestens einige Wochen gelagert hatten.

Von einem in zwei Querhälften geschnittenen Blutegel wurde eine Längshälfte des Rückenmuskels von Nerven und Eingeweide freipräpariert. Das aus etwa 25 Gliedern bestehende Muskelpräparat befand sich an einem 1 : 9, 2 vergrößerenden Schwedenhebel mit einem Gegengewicht von etwa 4, 8 g in einem zylindrischen Bad, Durchmesser 1, 5 cm, von 10 ml Inhalt, durch welches Sauerstoff perlte, und welches mit Zu- und Ableitungen versehen war. Registriert wurde fortlaufend mit einem Kymographion [103], welches pro Stde. 6, 8 cm lief. Während des anfänglichen, 30 Min. beanspruchenden Erschlaffens wurde öfter mit Badflüssigkeit gespült. Für 1 l dieser R i n g e r - Q u a s t e l-Lösung [104] wurden 32 ml einer 1 proz. KCl-Lösung, 18 ml einer 1 proz. Lösung von $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$, 71 ml einer 10 proz. NaCl-Lösung, 0, 12 g $NaHCO_3$ und 0, 77 g Traubenzucker DAB 6 verwandt. Nach dem Erschlaffen wurde durch Zugabe von 0, 2 ml Eserin-Lösung, 1 : 2000,

20 Min. lang sensibilisiert. Die zu prüfenden Lösungen wirkten genau 3 Min. lang ein und wurden verglichen mit Lösungen von 0,05 - 0,1 γ/10 ml Acetylcholinchlorid. Die Eserinmenge wurde nach dem Wiedererschlaffen vor jeder Prüfung der Badflüssigkeit und jeder zu prüfenden Lösung zugefügt.

Die durch geeignetes Verdünnen der Inkubationsansätze erhaltenen Kurven wurden mit dem Standard verglichen. Dabei wurde für Abweichungen bis zu $\pm$ 20 % näherungsweise eine lineare Abhängigkeit der Kontraktion von der Acetylcholinkonzentration angenommen[28]. Die Auswertung wurde nach Fixierung des berußten Glanzpapiers mit alkoholischer Schellack-Lösung durch Ausmessen vorgenommen.

ß) Chemische Methoden:

Der chemische Test wurde nach S. H e s t r i n [32] vorgenommen. Der Inkubationsansatz wurde nach der Inkubation mit 0,1 ml 2n HCl versetzt, 6 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und unter fließendem Wasser abgekühlt. Dann wurden 4 ml einer Mischung von 2 ml einer 13,9 proz. $NH_2OH \cdot HCl$-Lösung und 2 ml einer 13,9 proz. NaOH zugesetzt und nach frühestens 1 Min. je 2 ml 3,3 n HCl und 2 ml 10 proz. $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ in 0,1 n HCl zugesetzt. Die entstandene Rotfärbung wurde wie bei der AcP-Bestimmung im Spektralphotometer gemessen. Als Blindwert diente ein Ansatz ohne energiereiche Verbindung (ATP, AcP) oder ohne Enzym.

d) Inkubationsbedingungen

α) Allgemeines:

Zum Nachweis der Fermentaktivitäten wurden soweit nicht anders angegeben jeweils Inkubationsansätze von 2 ml in Reagenzgläsern mit Mattstreifen (Schott & Gen., Mainz) im Wasserbad bei 28°C (± 1°) über Nacht 14-16 Stdn. inkubiert.

ß) Acetokinase:

Zur Bestimmung des AcP im Acetokinasetest enthielten die Inkubationsansätze im ml: 1 mg Cystein · HCl oder Glutathion (Schwarz Laboratories, Inc., USA), 0,2 mg $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (= 10^{-6} Mol), 9,8 mg Kaliumacetat, 0,05 ml einer neutralen Hydroxylamin-Lösung (aus 2 g Hydroxylamin · HCl in 10 ml 2n KOH), 1 mg $ATPNa_2 \cdot 4\ H_2O$ (Schwarz Laboratories, Inc., USA).

γ) Acetylcholinsynthese zur Prüfung von Phosphotransacetylase und Cholinacetylase:

1) Inkubationslösung:

Die Inkubationsansätze enthielten im ml: 1 mg $AcPLi_2$ (76-80 proz.), 1 mg Cystein · HCl oder Glutathion, 0,2 mg $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (= 10^{-6} Mol), 0,1 mg CoA (P-L Biochemicals Inc., USA), 0,25 mg Prostigmin · HBr ®, 1 mg Cholinchlorid (E. MERCK, Darmstadt), 9,8 mg Kaliumacetat. Zum Nachweis von Phosphotransacetylase- oder Cholinacetylaseaktivität der Biene über gebildetes AcCh mußten dem Ansatz 0,05 ml Fliegencholinacetylase oder Fliegenphosphotransacetylase zugesetzt werden.

2) Acetylphosphatdarstellung:

Das Dilithiumsalz des Acetylphosphats wurde nach R. Bentley [105] aus Keten und Phosphorsäure (Ausbeute 63 % Rohprodukt) oder nach A.W.D. Avison [106] in wäßriger Lösung aus Dikalium-

hydrogenphosphat und Essigsäureanhydrid (Ausbeute 62 % Rohprodukt) hergestellt und als Lithiumsalz ausgefällt.

3) Fliegenenzyme:

Fliegenphosphotransacetylase und Fliegencholinacetylase wurden nach A. R o t h [13] mit kleinen Änderungen dargestellt. So wurde das Acetontrockenpulver nach dem Muster der Bienenaufarbeitung (B. a) hergestellt. Die angereicherten Enzymfraktionen wurden in 1/10 des Extraktvolumens gelöst.

B) Der zellfreie Extrakt der Biene

a) Herkunft der Bienen, Bereitung von Acetontrockenpulver und Extrakt.

α) Herkunft der Bienen:

Die Bienen (Apis melifera carnica) wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Bienenzucht, Erlangen, Burgbergstr. 70, (Direktor Dr. F.K. B o e t t c h e r) in den Monaten August und September zur Verfügung gestellt [107]. Die Bienen befanden sich in sogenannten Einwabenkästen zu etwa 150 Exemplaren. Die Einwabenkästen werden zur Züchtung von Königinnen (Weiseln) mit einem kleinen Anteil eines Volkes und mit einer soeben geschlüpften Königin beschickt. Wenn die Königin wieder entnommen wird, ist das Volk weisellos und wird gewöhnlich vernichtet. Diese weisellosen Völker wurden von uns verarbeitet.

ß) Herstellung von Acetontrockenpulver der Biene:

Zur Narkose der Bienen wurde Kohlendioxid aus einer Stahlflasche in den Einwabenkasten eingeleitet. Der Kasten stand in einem großen Emailtopf, in dem das CO_2 sich ansammelte. Dadurch konnte man in aller Ruhe den Kasten öffnen, ohne daß die Tiere wieder aufwachten. Sie wurden in einem Becherglas, gefüllt mit CO_2, gewogen und etwa 70 g Bienen in einen vorgekühlten (-15°) Multimix der Firma BRAUN in die zehnfache Menge vorgekühltes Aceton (-15°) gegeben. Es wurde 2 Min. bei höchster Geschwindigkeit zerkleinert und die entstandene Suspension in vorgekühlte 600-ml-Zentrifugenbecher einer Stock-Zentrifuge geschüttet, 15 Min. im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und 15 Min. in der Stock-Zentrifuge bei 5000 U/Min. abzentrifugiert. Der gelbe Überstand wurde abgegossen und der Bodensatz mit der gleichen Menge tiefgekühltem Aceton aufgeschwemmt. Man ließ abermals 15 Min. im Kühlschrank stehen und zentrifugierte dann 20 Min. ab. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und der Bodensatz dann in einer großen Reibschale bis zur Trockne verrieben. Das erhaltene Pulver wurde einige Stunden an der Luft auf Papier ausgebreitet, bis der Geruch des Acetons verschwunden war. Das erhaltene Acetontrockenpulver wurde bei -15°C im Exsikkator aufbewahrt und war jahrelang haltbar.

γ) Gewinnung von zellfreiem Extrakt:

1 g Bienen-Acetontrockenpulver wurde mit 1 g Aluminiumpulver (Fa. Riedel-de Haën, feines Pulver) in einer vorgekühlten Reibschale von etwa 11 cm Durchmesser 2 Min. lang fest verrieben, anschliessend in 20 ml vorgekühlter Extraktionslösung (3,7 mg KCl, 1,74 mg K_2HPO_4 pro ml ; p_H 6,8 mit 2n HCl) suspendiert und 2 Stdn. lang alle 15 Min. 2 Min. lang unter kräftigem Reiben extrahiert, wobei die Reibschale zwischendurch im Eisschrank gekühlt wurde. Die Suspension zentrifugierte man 30 Min. in einer Kühlzentrifuge (Universal

III KS ; Fa. CHRIST) bei 20 000 U/Min. und 0°C. Die überstehende, klare, gelb-braune Flüssigkeit von 15-16 ml stellte den zellfreien Extrakt dar.

Da diese Methode zur Herstellung größerer Mengen zellfreien Extraktes sehr mühselig ist, wurde für Großansätze die Extraktion in einem Multimix ausgeführt. Der Multimix wurde im Kühlraum bei +4°C aufgestellt, und für 10 g Acetontrockenpulver wurde 10 g Aluminiumpulver und 200 ml Extraktionslösung verwendet. Dann wurde 2 Stdn. lang alle 15 Min. 2 Min. lang bei höchster Tourenzahl turbiniert und anschließend wie oben zentrifugiert.

Die nach beiden Methoden hergestellten Extrakte enthielten zwischen 5 und 10 mg Protein im ml, gemessen mit der Biuret-Methode.

b) Nachweis von Acetokinase, Phosphotransacetylase und Cholinacetylase

Tabelle 1. Acetokinase

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase mit 0, 5 ml Extrakt, im Blindwert kein ATP.

	$E \cdot 10^3$	$\gamma AcPLi_2/ml$
Extrakt, Aufarbeitung vom 6. 8. 63. (Reibschale)	700	520
" " " 10. 8. 63. "	775	570
" " " 20. 8. 63. "	750	570
" " " 20. 10. 63. "	640	470
" " " 1. 12. 64. (Multimix)	380	282
Dialysierter Extrakt " 6. 8. 63. (Reibschale) 16 Stdn., 4°C, dest. Wasser	1000	740

Die Dialyse wurde im Cellophan-Dialysierschlauch (2 cm Durchmesser) der Fa. KALLE & Co., Wiesbaden-Biebrich, vorgenommen.

Tabelle 2. Acetokinase und Acetylcholinsynthese

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase; zusätzlich 0,25 mg/ml Prostigmin · HBr, 1 mg/ml Cholinchlorid, 0,1 mg/ml CoA, 0,5 ml Extrakt. AcCh wurde biologisch bestimmt.

		γ AcCh/ml
Extrakt, Aufarbeitung vom	6.8.63.	95
" " "	10.8.63.	190
" " "	27.8.63.	245

Tabelle 3. Acetylcholinsynthese

Inkubationsansätze nach A. d. für AcCh-Synthese; AcCh wurde biologisch bestimmt.

			γ AcCh/ml
Extrakt, Aufarbeitung vom	6. 8.63.	(Reibschale)	53
" " "	27. 8.63.	"	149
" " "	1.12.63.	(Multimix)	75
Dialysierter Extrakt 60 Stdn., 4°C, dest. Wasser		(Reibschale)	120

Tabelle 4. p_H-Optimum der Acetylcholinsynthese

Inkubationsansätze nach A. d. für AcCh-Synthese mit 0,5 ml Extrakt; die p_H-Werte wurden mit Lyphan-Papier gemessen. AcCh wurde biologisch bestimmt.

p_H	γ AcCh/ml
7,8	108
7,5	110
6,6	100
6,1	40
5,8	58

Tabelle 5. Erwärmen des Extraktes bei verschiedenen Temperaturen.

3 ml des Extraktes wurden im Reagenzglas 2 Min. im Wasserbad bei der angegebenen Temperatur gehalten, im fließenden Wasser gekühlt und bis zum Test in der Kühltruhe (-15°) aufbewahrt.
Inkubationsansätze nach A. d. in Spalte 2 für Acetokinase, in Spalte 3 und 4 für AcCh-Synthese mit 0, 5 ml Extrakt. AcCh wurde biologisch bestimmt.

Temperatur	Acetokinase $\gamma AcPLi_2$/ml	Phosphotransacetylase γAcCh/ml	Cholinacetylase γAcCh/ml
unbehandelt	310	70	50
40°	340	82	39
45°	347	70	77
50°	303	64	83
60°	281	75	51

Tabelle 6. Verschieden langes Erwärmen des Extraktes.

3 ml Extrakt wurden während der angegebenen Zeiten auf 50° C erhitzt und wie in Tabelle 5 behandelt.

Zeit [Min.]	Acetokinase $\gamma/AcPLi_2$/ml	Phosphotransacetylase γAcCh/ml	Cholinacetylase γAcCh/ml
unbehandelt	326		
2	348	98	65
4	318	89	60
8	296	62	61
16	326	74	55

Tabelle 7. Hemmung der Acetokinaseaktivität durch Fluoridionen.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase mit 0, 5 ml Extrakt.

Zusätze:	$\gamma AcPLi_2$/ml
---	155
KF 1 mg/ml	17

c) Nachweis von Myokinase

Tabelle 8. Nachweis von Myokinase im Extrakt.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase, ohne ATP, mit 0, 5 ml Extrakt.

Zusätze:	$\gamma AcPLi_2$/ml
ATP 1 mg/ml	166
ADP 1 mg/ml	104

d) Nachweis von Adenosintriphosphatase (ATPase)

Tabelle 9. ATPase im Extrakt.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase. Als Enzymquelle für ATPase-freie Acetokinase diente die Fraktion A_{10} aus Streptobacterium plantarum 10S [46].

Zusätze:	$\gamma AcPLi_2$/ml
0, 25 ml A_{10}	960
0, 5 ml Extrakt	310
0, 25 ml A_{10} und 0, 5 ml Extrakt	540

e) Nachweis von saurer Acetylphosphatase

Tabelle 10. Saure Acetylphosphatase im Extrakt.

Die mit 2n HCl wie angegeben eingestellten 2-ml-Inkubationsansätze enthielten pro ml : 136 mg Natriumacetat, 1 mg $AcPLi_2$ und 0,25 ml Extrakt. Als Blindwert diente ein Röhrchen ohne $AcPLi_2$. Als Vergleichswert diente ein Röhrchen ohne Enzym. Die Bestimmung des nicht hydrolysierten $AcPLi_2$ erfolgte nach A. b. α.

Inkubationszeit [Min.]	enzymatisch abgebautes $AcPLi_2$ in % p_H 6,8	p_H 5,5
10	49	51
20	41	78
30	58	92
45	74	100
120	100	100

Tabelle 11. Hemmung der sauren Acetylphosphatase durch Fluoridionen

Inkubationsansätze wie in Tabelle 10 bei p_H 5,5. Inkubationszeit 3 Stdn. Als Enzymquelle für saure Phosphatase dienten 0,5 ml der in Abschnitt C. a. beschriebenen, durch Säurefällung bei p_H 4,9 erhaltenen Proteinfraktion.

Zusätze:	enzymatisch abgebautes $AcPLi_2$ in %
---	100
KF 1 mg/ml	100

f) Versuch zum Nachweis von Acetthiokinase

Tabelle 12. Acetthiokinase im Extrakt.

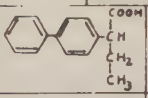
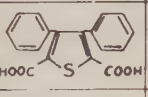
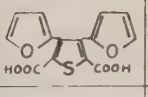
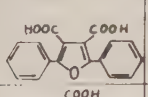
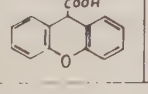
Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase mit 0,5 ml Extrakt.

Zusätze:	1	2	3	4
CoA 0,1 mg/ml	-	+	-	+
KF 1 mg/ml	-	-	+	+
$AcPLi_2$ γ/ml	156	192	18	18

g) Hemmstoffversuche mit Extrakt

Tabelle 13. Carbonsäuren als Hemmstoffe.

Inkubationsansätze für Acetokinase nach A. d. mit 0, 5 ml Extrakt; für die Acetylcholinsynthese mit ATP als Energiequelle wie in Tabelle 2 beschrieben, jedoch ohne CoA ; für die Acetylcholinsynthese mit $AcPLi_2$ als Energielieferant nach A. d. für AcCh-Synthese mit 0, 5 ml Extrakt, jedoch ohne CoA. AcCh wurde biologisch bestimmt. Die in der Tabelle angegebenen Werte sind die Quotienten aus gebildetem $AcPLi_2$ oder AcCh m i t Hemmstoffzusatz und gebildetem $AcPLi_2$ oder AcCh o h n e Hemmstoffzusatz.

Zusätze	γ/ml Coenzym A	100		20					
	Energielieferant 1 mg/ml	ATP	AcP	ATP	AcP	ATP	AcP	ATP	AcP
	Hemmstoffmenge γ/ml	1000	1000	1000	1000	330	330	100	100
	AcCh-Synthese			1.0, 0.7		0.8		0.9	
	Acetokinase	1	0,5	0,7	0,8; 1		1	0,7	0,9
	AcCh-Synthese			0,6, 0,6		0,8		0,9	
	Acetokinase	0,7	0,6	0,7	1 , 1		1	0,7	1
	AcCh-Synthese			0,7; 0,8		0,7		0,8	
	Acetokinase	1	0,7	0,5	1; 1		1	0,7	1
	AcCh-Synthese			0,6, 0,6		0,8		0,9	
	Acetokinase	0,5	0,7	0,3	0,7; 0,5		0,9	1	1
	AcCh-Synthese			0,5, 0,6		0,8		0,9	
	Acetokinase	0,7	0,5	0,5	0,5; 0,7		1	1	0,9

C) Reinigungsversuche der einzelnen Enzyme

a) Versuche zur Vortrennung

α) Vorversuche:

1) Säurefällung des Extraktes [108]:

20 ml zellfreier Extrakt wurden in einem 100-ml-Weithalserlenmeyerkolben mit Eis gekühlt und tropfenweise mit 10proz. Essigsäure bis p_H 6,0 (Spezialindikator Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren) versetzt. Die Fällung wurde 15 Min. im Kühlschrank belassen und dann in der Kühlzentrifuge bei 20.000 U/Min. abzentrifugiert. Das Überstehende wurde nach Entnahme einer Probe von 2 ml weiter angesäuert wie in Tabelle 14 angegeben und der Niederschlag in 20 ml Extraktionslösung suspendiert und wie die 2 ml-Probe auf p_H 6,8 mit 0,1 n KOH eingestellt. Analog wurde mit den weiteren Fällungen verfahren.

Tabelle 14. Fraktionierte Säurefällung des Extraktes.

Inkubationsansätze für AcCh-Synthese nach A.d., für saure Acetylphosphatase nach Tabelle 10 mit jeweils 0,5 ml der Fraktionen. AcCh wurde biologisch bestimmt.

p_H der Fällung		Phosphotransacetylase γAcCh / ml		Cholinacetylase γAcCh / ml		saure Phosphatase % abgebautes $AcPLi_2$ nach 1,5 Stdn.	
6,0	Niederschlag	60		40		22	
	Überstand		75		78		100
5,2	Niederschlag	109		11		22	
	Überstand		120		58		100
4,7	Niederschlag	39		5,6		0	
	Überstand		80		15		100
Extrakt ohne Fliegenenzyme		62 γAcCh / ml					100

Tabelle 15. Säurefällung bei p_H 4,5 .

Inkubationsansätze nach A.d. für Acetokinase und AcCh-Synthese mit jeweils 0,5 ml des suspendierten Niederschlages und des Überstandes einer Säurefällung bei p_H 4,5 , welche über Nacht im Eisbad gestanden hatte. AcCh wurde biologisch bestimmt.

	Acetokinase	Phosphotransacetylase	Cholinacetylase
	$\gamma AcPLi_2$/ml	γ AcCh / ml	γ AcCh / ml
Niederschlag	55	10	<10
Überstand	155	10	<10

2) Ammonsulfatfällung

Zu 20 ml eisgekühltem Extrakt wurden unter kräftigem Umschwenken im Eisbad 3,2 g feinst gepulvertes Ammonsulfat (0-16 g/Vol.%) gegeben. Man ließ 15 Min. im Eisbad und zentrifugierte dann 15 Min. in der Kühlzentrifuge bei 20.000 U/Min. und 0°. Der Niederschlag wurde in 20 ml Extraktionslösung gelöst und die überstehende Lösung im Eisbad analog mit 3,2 g Ammonsulfat (16-32 g/Vol.%) gefällt. Die weiteren Schritte wurden nach der gleichen Methode vorgenommen.

Tabelle 16. Fraktionierte Ammonsulfatfällung.

Inkubationsansätze wie in Tabelle 14 und 15. Inkubationszeit für Phosphatase 45 Min.

% $(NH_4)_2SO_4$	Acetokinase $\gamma AcPLi_2$/ml	Phosphotransacetylase γAcCh/ml	Cholinacetylase γAcCh/ml	saure Phosphatase % abgebautes $AcPLi_2$
0 - 16	22	36	<10	7
16 - 32	466	270	195	14
32 - 48	555	75	80	25
48 - 64	55	25	<25	0

3) Acetonfällung:

Im Eisbad wurden zu 20 ml Extrakt in einem 375 ml fassenden Zentrifugenbecher 20 ml auf -15° vorgekühltes Aceton (0-50 Vol.%) unter Rühren zugetropft. Nach 15 Min. Stehenlassen im Eisbad wurde der entstandene Niederschlag bei 4500 U/Min. innerhalb 15 Min. in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert und in 20 ml Extraktionslösung aufgelöst. Zu der überstehenden Lösung wurden weitere 10 ml Aceton (50-60 Vol.%) getropft und analog verfahren. Nach diesem Schema wurden die unten angegebenen Acetonfraktionen erhalten.

Tabelle 17. Fraktionierte Acetonfällung.

Inkubationsansätze wie in Tabelle 16.

% Aceton	Acetokinase $\gamma AcPLi_2$/ml	Phosphotransacetylase γAcCh/ml	Cholinacetylase γAcCh/ml	saure Phosphatase %abgebautes $AcPLi_2$
Extrakt	445	90	80	100
0 - 50		75	100	100
50 - 60		30	‹10	46
60 - 70		‹10	‹10	0
0 - 20	96	60	33	20
20 - 33	126	103	46	25
33 - 50	475	68	110	85
50 - 60	67	29	‹5	30

Tabelle 18. Kombinierte Aceton-Ammonsulfat-Fällung; Fraktion Ma.

Aus der Fraktion 0-33 % Aceton (I) und der Fraktion 33-50 % Aceton (II) wurden Ammonsulfatfraktionen bereitet wie angegeben. Die Kombination 33-50 % Aceton und 32-48 % Ammonsulfat ergab in 2 ml Extraktionslösung gelöst die Fraktion Ma.

Inkubationsansätze wie in Tabelle 16.

$\%(NH_4)_2SO_4$ aus (I):	Acetokinase $\gamma AcPLi_2$/ml	Phosphotransacetylase $\gamma AcCh$/ml	Cholinacetylase $\gamma AcCh$/ml	saure Phosphatase %abgebautes $AcPLi_2$
0 - 16	0	17	5	3
16 - 32	63	91	20	0
32 - 48	55	98	40	0
48 - 64	0	10	5	0
aus (II):				
0 - 16	7	43	10	3
16 - 32	96	185	56	9
32 - 48	447	270	86	14
48 - 64	26	35	10	1,6

Tabelle 18a. Kombinierte Ammonsulfat-Aceton-Fällung; Fraktion Mb.

Durch 15 Min. Erhitzen von 20 ml Extrakt im Wasserbad bei 50°C und Ammonsulfatfraktionierung bei 20-48 % g/V wurde beim Auflösen in 2 ml Extraktionslösung die Fraktion Mb erhalten. Beim Auflösen in 20 ml Extraktionslösung wurde die Ausgangslösung für die folgende Fraktionierung gewonnen.

Inkubationsansätze wie in Tabelle 14 und 15.

$\%(NH_4)_2SO_4$	% Aceton	Phosphotransacetylase $\gamma AcCh$/ml	Cholinacetylase $\gamma AcCh$/ml
0 - 20		35	7
20 - 40		145	100
40 - 50		67	10
20 - 40	0 - 33	30	14,5
20 - 40	33 - 50	250	92
20 - 40	50 - 60	-	12

4) Alkoholfällung:

20 ml zellfreier Extrakt wurden in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben unter gelindem Umschwenken im Wasserbad von 50°C 15 Min. erhitzt und unter fließendem Wasser gekühlt. Der Niederschlag wurde 15 Min.

in einer Kühlzentrifuge bei 20.000 U/Min. abzentrifugiert und der Überstand mit Ammonsulfat fraktioniert. Der Niederschlag 20-48 % g/V Ammonsulfat wurde in 20 ml Extraktionslösung gelöst und analog der Acetonfällung mit Äthanol (petroläthervergällt) fraktioniert. Um eine vollständige Fällung zu erzielen, wurde nicht 15 Min. sondern 1 Stde. bis zum Zentrifugieren stehengelassen.

Tabelle 19. Fraktionierte Äthanolfällung.

Inkubationsansätze wie in Tabelle 14 und 15.

	Acetokinase $\gamma AcPLi_2/ml$	Phosphotransacetylase $\gamma AcCh/ml$	Cholinacetylase $\gamma AcCh/ml$
Extrakt	480		
erhitzter Extrakt	319		
$(NH_4)_2SO_4$ 20-48%	555	58	60
% Äthanol			
0 - 33	59	30	<10
33 - 50	48	30	<10
50 - 60	281	40	<10
60 - 70	281	20	< 5
0 - 50	33	34	5
50 - 66	430	51	<10
66 - 75	89	15	<10

Tabelle 20. n-Propanolfällung.

Analog der Äthanolfraktionierung wurde eine n-Propanolfraktionierung versucht. Inkubationsansätze wie in Tabelle 14 und 15.

	Acetokinase $\gamma AcPLi_2/ml$	Phosphotransacetylase $\gamma AcCh/ml$
Extrakt	290	68
erhitzter Extrakt	270	36
$(NH_4)_2SO_4$ 20-48%	436	60
% n-Propanol		
0 - 33	0	10
33 - 50	244	25
50 - 66	133	< 7

ß) Endgültige Vortrennung des zellfreien Extraktes, Bienenfraktion Mc.

80 ml des im Multimix bereiteten, zellfreien Extraktes wurden in einem 100 ml-Weithalserlenmeyerkolben unter gelindem Umschwenken im Wasserbad von 50°C 15 Min. erhitzt und unter fließendem Wasser und anschließend im Eisbad gekühlt. Zu dieser eisgekühlten Suspension wurden unter kräftigem Umschwenken im Eisbad 16 g feinst gepulvertes Ammonsulfat gegeben. Man beließ noch 15 Min. im Eisbad und zentrifugierte dann 15 Min. in der Kühlzentrifuge bei 20.000 U/Min. und 0°C. Der Niederschlag wurde verworfen und die überstehende Lösung im Eisbad analog mit 22,4 g Ammonsulfat gefällt (20-48 % g/V Ammonsulfat). Der Niederschlag wurde in 80 ml Extraktionslösung gelöst und in einen 325 ml fassenden Zentrifugenbecher der Kühlzentrifuge überführt und im Eisbad gekühlt. Im Eisbad wurden unter Rühren 40 ml auf -15°C vorgekühltes Aceton zugetropft. Nach 15 Min. Stehenlassen im Eisbad wurde der Niederschlag bei 4500 U/Min. in 15 Min. bei 0°C abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen und die überstehende Lösung im Eisbad analog mit 40 ml vorgekühltem Aceton versetzt. Der abzentrifugierte Niederschlag (33-50 % Aceton) wurde in 80 ml Extraktionslösung gelöst und in einen 100-ml-Weithalserlenmeyerkolben überführt und im Eisbad gekühlt. Durch Zusatz von 38,4 g Ammonsulfat wurde das Protein gefällt und nach 15 Min. Stehenlassen im Eisbad für 15 Min. bei 20.000 U/Min. und 0°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde entweder in 8 ml Extraktionslösung zur Fraktion Mc oder in 3 ml Extraktionslösung zur Fraktion Mc conc. gelöst.

14-stündige Dialyse von 3 ml Fraktion Mc im Cellophandialysierschlauch (Durchmesser 2 cm) gegen 2 Liter Phosphatpufferlösung (1,38 g KH_2PO_4 und 1,75 g K_2HPO_4 zum Liter gelöst; p_H 6,8 [109]) bei 4°C lieferte 4,5 ml dialysierte Fraktion Mc.

Tabelle 21. 2. Ammonsulfatfällung der endgültigen Vortrennung.

Inkubationsansätze wie in Tabelle 14 und 15.

% $(NH_4)_2SO_4$	Acetokinase $\gamma AcPLi_2$/ml	Phosphotrans-acetylase $\gamma AcCh$/ml	Cholinacetylase $\gamma AcCh$/ml
0 - 20	11	35	18
20 - 40	348	390	200
40 - 50	490	370	140

Der Proteingehalt der einzelnen Stufen nimmt folgenden Verlauf:

	Biuret			Methode nach Lowry		
	Eingesetzte Menge	$E \cdot 10^3$	mg/ml	Eingesetzte Menge	$E \cdot 10^3$	mg/ml
Extrakt	1 ml	385	6,75			
erhitzter Extrakt	1 ml	275	4,72			
Niederschlag von 0-20% $(NH_4)_2SO_4$	1 ml	75	1,3	0,1 ml	135	1,18
Niederschlag von 20-48% $(NH_4)_2SO_4$	1 ml	200	3,5	0,1 ml	400	3,6
Niederschlag von 0-33% Aceton	1 ml	80	1,4	0,1 ml	210	1,85
Niederschlag von 33-50% Aceton	1 ml	80	1,4	0,1 ml	165	1,45
Fraktion Mc	0,5 ml	240	8,4	0,01 ml	95	8,4

b) Chromatographische Methoden

α) Ionenaustauscher.

1) Vorbehandlung der Ionenaustauscher:

Eine bestimmte Menge Sephadex-Ionenaustauscher wurde abgewogen und in einem ausreichenden Volumen Wasser zum Quellen aufgeschwemmt. Um feine Partikel abzuschneiden, wurde nach ca. 15 Min. dekantiert und erneut aufgeschwemmt. Der Vorgang wurde 3-4 mal wiederholt, bis sich die Perlen mit einer scharfen Grenzfläche abgesetzt hatten, ohne daß noch kleinere Perlen, die das Wasser etwas trüb erscheinen ließen, im Überstehenden sich befanden. Das Gel wurde dann auf ein Faltenfilter übergespült und pro 2 g Sephadex-Ionenaustauscher mit 100 ml 0,5 n HCl (für DEAE-Sephadex) oder 0,5 n NaOH (für CM- und SE-Sephadex) übergossen und mit Wasser bis zur Neutralität des Filtrats gewaschen. Dann wurde mit 0,5 n NaOH (für DEAE-Sephadex) oder 0,5 n HCl (für CM- und SE-Sephadex) der Vorgang wiederholt und zum Schluß mit 0,05 m Phosphatpuffer von gewünschtem p_H gewaschen, bis das Filtrat den gleichen p_H wie der Puffer hatte.
Damit war das Gel zur Chromatographie vorbereitet und wurde entweder sofort auf die Säule gegeben oder im Kühlschrank bei 4°C in der Phosphatpufferlösung gelagert.

2) Bau eines linearen Gradientenmischers:

Nach der Zusammenfassung über Gradientenelution von K. Dorfner [66] wurde ein linearer Gradientenmischer entworfen und vom Glasbläser [110] angefertigt (Abbildung 4).

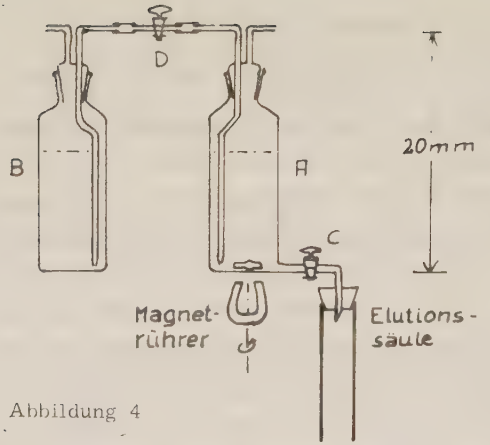


Abbildung 4

Die beiden Flaschen A und B sind durch ein kommunizierendes Rohr über einen Hahn D miteinander verbunden. Dadurch ist der Flüssigkeitsspiegel in beiden Flaschen gleich hoch, wenn Lösung aus dem Hahn C ausfließt. In A befindet sich zu Beginn des Versuchs die Lösung mit der Anfangskonzentration und in B die gleiche Menge Lösung mit der Endkonzentration. Das Verbindungsrohr wird zunächst mit Lösung der Flasche A gefüllt, der Hahn D wird geschlossen und das Verbindungsrohr eingesetzt. Dann kann der Hahn D geöffnet werden. Der Auslaufhahn C der Flasche A, der mit einem Gummistopfen mit der Säule verbunden ist, wird nun geöffnet. Gleichzeitig wird unter der Flasche A der Magnetrührer angestellt, so daß die zusammenfließenden Lösungen immer gut durchmischt sind. Das erste Eintreffen der Lösung aus der Flasche B in Flasche A wird durch die Bildung von Schlieren beobachtet. Von diesem Zeitpunkt ab rechnet man mit dem Beginn des Gradienten.

Um die Linearität des Gradienten zu prüfen, wurde eine Lösung von 0,04 g K_2CrO_4 in einem Liter 0,05 n NaOH hergestellt, wie sie zum Eichen von Spektralphotometern Verwendung findet [112, 111].

Hiervon wurden 100 ml in das Gefäß B gegeben, und im Gefäß A befanden sich 100 ml 0,05 n NaOH. Dann wurden 10-ml-Fraktionen aufgefangen und im Spektralphotometer PMQ II bei 370 mμ, Schichtdicke 2 cm, gemessen. Beim Abtragen der Extinktion gegen die ausgeflossene Menge wurde eine Gerade erhalten.

3) DEAE-Sephadex:

Tabelle 22. Trennung auf dem Büchnertrichter.

1,5 g vorbehandeltes DEAE-Sephadex A-50 medium wurden auf einen mit Filterpapier ausgelegten Büchnertrichter (Durchmesser 5 cm) gebracht, und nach dem Einsickern des Puffers wurden 1,75 ml Fraktion Ma dialysiert gleichmäßig aufgebracht. Eluiert wurde mit Phosphatpuffer, dem wie unten angegeben steigende KCl-Konzentrationen zugegeben waren. Aufgefangen wurden Fraktionen zu 10 ml in zuvor markierten Reagenzgläsern, die von Hand unter dem Trichter gewechselt wurden.

Die Fraktionen wurden einzeln in einer Quarzküvette bei 280 mμ gemessen. Das Röhrchen mit der höchsten Extinktion wurde zu Testen herangezogen.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase und AcCh-Synthese mit jeweils 1 ml der Fraktionen. AcCh wurde biologisch bestimmt.

Elutionsmittel	Acetokinase γAcPLi$_2$/ml	Cholinacetylase γAcCh/ml
Versuch 1		
200 ml Phosphatpuffer	11	≪12
200 ml " + 0,07 m KCl	30	32
200 ml " + 0,17 m KCl	192	20
200 ml " + 0,405 m KCl	55	≪10
Versuch 2		
100 ml Phosphatpuffer	44	≪10
100 ml " + 0,033 m KCl	0	⟨10
200 ml " + 0,1 m KCl	100	30
200 ml " + 0,2 m KCl	200	⟨10

(Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite!)

Versuch 3

100 ml Phosphatpuffer	44	‹5
100 ml " + 0,033 m KCl	0	3,8
100 ml " + 0,07 m KCl	7	15
100 ml " + 0,1 m KCl	30	25
100 ml " + 0,2 m KCl	200	30

Tabelle 23. Trennung auf der Säule.

0,5 g vorbehandeltes DEAE-Sephadex A-50 medium wurden in eine mit etwas Glaswolle verschlossene Säule von 1,5 cm Durchmesser und 15 cm Höhe eingefüllt und standen 4 cm hoch. Nach dem Einsickern des Puffers wurden 2,5 ml Fraktion Mb dialysiert gleichmäßig aufgebracht. Eluiert, aufgefangen und inkubiert wurde wie in Tabelle 22 beschrieben.

Elutionsmittel	Aceto-kinase	Phospho-transace-tylase	Cholinacety-lase
	$\gamma AcPLi_2$/ml	γAcCh/ml	γAcCh/ml
Ausgangslösung: Mb dialysiert 0,05 ml	540	84	73
100 ml Phosphatpuffer p_H 7,8	100	24	21
100 ml " p_H 6,8	7	‹5	5
100 ml " p_H 6,0	0	‹5	‹5
100 ml " p_H 6,0 + 0,13 m KCl	275	105	86
100 ml " p_H 6,0 + 0,4 m KCl	107	106	17
100 ml " p_H 6,0 + 0,81 m KCl	7	9	‹‹5

Abbildung 5 : Stufenweise Elution mit KCl.

0,5 g vorbehandeltes DEAE-Sephadex A-50 medium wurde wie in Tabelle 23 in eine Säule gefüllt und ein ml Fraktion Mb dialysiert aufgegeben. Eluiert wurde mit jeweils 20 ml 0,05 m Phosphatpufferlösung, der 0 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; 0,10 ; 0,12 ; 0,14 ; 0,16 ; 0,18 ; 0,20 ; 0,22 ; 0,24 ; 0,26 ; 0,28 ; 0,30 ; 0,32 ; 0,34 ; 0,36 ; 0,38 und 0,40 m KCl zugesetzt waren. Pro 20 ml

Eluat wurde 1 ml entnommen und wie in Tabelle 22 inkubiert. AcCh wurde chemisch bestimmt. Wiederholungen des Versuches mit 1,0 und 2,0 g DEAE-Sephadex zeigten das gleiche Ergebnis.
Als höchste Aktivität (= 100 %) wurde für Acetokinase 295γ/ml $AcPLi_2$, für Phosphotransacetylase 100γ/ml AcCh und für Cholinacetylase 65 γ/ml AcCh gefunden.

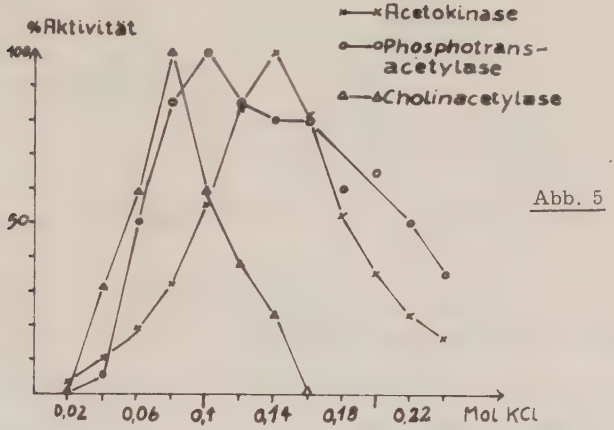


Abb. 5

Abbildung 6 : Stufenweise Elution mit Na_2SO_4.

Versuchsbedingungen wie in Abbildung 5 mit äquimolaren Konzentrationen $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$ an Stelle von KCl als Elutionsmittel. Als höchste Aktivitäten (= 100 %) wurde für Acetokinase 295γ/ml $AcPLi_2$, für Phosphotransacetylase 83γ/ml AcCh und für Cholinacetylase 55γ/ml AcCh gefunden.

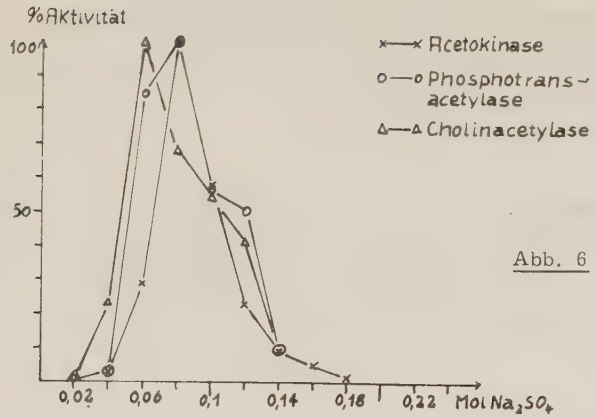


Abb. 6

Abbildung 7 : Verschiedene Ammonsulfatfraktionen bei der stufenweisen Elution mit KCl.

Versuchsbedingungen wie in Abbildung 6 mit 2,6 ml dialysierter Fraktion, die analog der Tabelle 18a aus erhitztem Extrakt als Ammonsulfat zwischen 20 - 35 % g/V (oberer Teil der Abbildung) bzw. zwischen 35 - 48 % g/V (unterer Teil der Abbildung) gewonnen wurde.

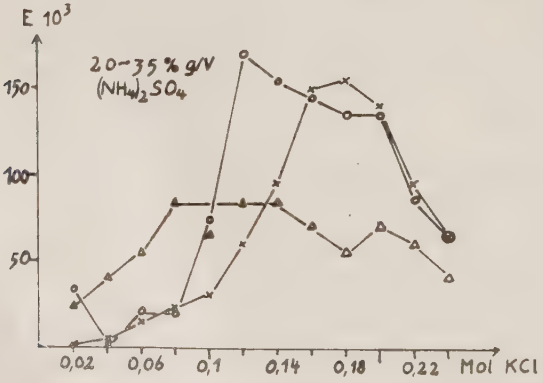


Abb. 7

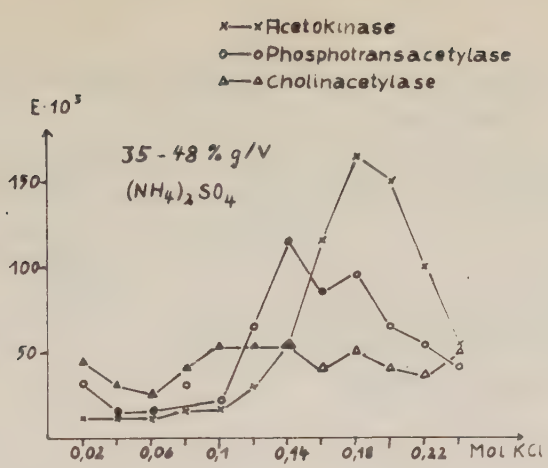


Abb. 7

4) CM-Sephadex:

Tabelle 24. Trennung auf der Säule.

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 23 mit 0,5 g CM-Sephadex C-50 medium und mit 1,5 ml Fraktion Mb dialysiert.

Elutionsmittel	Acetokinase γAcPLi$_2$/ml	Phosphotrans-acetylase γAcCh/ml	Cholinace-tylase γAcCh/ml
Ausgangslösung: Mb dialysiert 0,05 ml	263	60	40
100 ml Phosphatpuffer	163	40	≪10
100 ml " + 0,07 m KCl	181	26	≪5
100 ml " + 0,17 m KCl	30	<10	≪5
100 ml " + 0,4 m KCl	0	≪5	≪5

Tabelle 25. Trennung mit steigendem p_H und steigender KCl-Konzentration.

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 23 mit 0,5 g CM-Sephadex C-50 medium und mit 1 ml Fraktion Mb dialysiert.

Elutionsmittel	Acetokinase γAcPLi$_2$/ml	Phosphotransacetylase γAcCh/ml	Cholinacetylase γAcCh/ml
Versuch 1 :			
Ausgangslösung: Mb dialysiert 0,05 ml	336	60	70
100 ml Phosphatpuffer p_H 6,0	61	50	≪5
100 ml " p_H 6,6	67	40	≪5
100 ml " p_H 7,5	70	50	4,5
100 ml " p_H 7,5 + 0,14 m KCl	0	10	≪5
100 ml " p_H 7,5 + 0,4 m KCl	0	≪10	≪5
Versuch 2 :			
Ausgangslösung: Mb dialysiert 0,05 ml	660	100	70
100 ml Phosphatpuffer p_H 6,0	11	≪5	5
200 ml " p_H 6,8	370	40	10
100 ml " p_H 7,5	26	15	<5
100 ml " p_H 8,0	11	<5	≪5
100 ml " p_H 8,0 + 0,14 m KCl	11	≪5	≪5

5) SE-Sephadex:

Tabelle 26. Trennung auf der Säule.

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 23 mit 0,5 g SE-Sephadex C-50 medium und mit 1,0 ml Mb dialysiert.

Elutionsmittel:	Acetokinase $\gamma AcPLi_2$/ml	Phosphotransacetylase γAcCh/ml	Cholinacetylase γAcCh/ml
100 ml Phosphatpuffer p_H 6,0	890	139	143
100 ml " p_H 6,8	11	<5	$\ll 5$
100 ml " p_H 7,5	30	<5	$\ll 5$

6) Phosphorylzellulose:

Tabelle 27. Trennung auf der Säule.

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 23 mit 1,0 g Phosphorylzellulose[64], die wie Sephadex-Ionenaustauscher vorbehandelt war, mit 1,5 ml Mc dialysiert. Fraktionen zu 1,8 ml wurden am Fraktionsschneider (C.b.ß.1.) aufgefangen. Davon wurden jeweils 0,5 ml zum Test herangezogen. AcCh wurde chemisch bestimmt.

Elutionsmittel:		Acetokinase $\gamma AcPLi_2$/ml	Phosphotransacetylase γAcCh/ml	Cholinacetylase γAcCh/ml
40 ml Phosphatpuffer p_H 6,8				
Röhrchen Nr.:	21	15	<5	<5
	35	480	123	115
	30	170	53	38

Abbildung 8 : Gradientenelution mit KCl.

1,5 g vorbehandeltes DEAE-Sephadex A-50 medium wurde wie in Tabelle 23 in eine Säule gefüllt und 2 ml Fraktion Mc dialysiert aufgebracht. Eluiert wurde mit 100 ml eines linearen Gradienten aus 50 ml 0,05 m Phosphatpufferlösung und 50 ml einer Lösung von 0,5 m KCl in 0,05 m Phosphatpuffer. Aufgefangen wurden 50 Fraktionen zu 1,8 ml mit Hilfe des Fraktionsschneiders (C. b. ß. 1.). Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase und AcCh-Synthese mit jeweils 0,8 ml der eluierten Fraktion.

Bei Wiederholungen mit 12 und 15 g DEAE-Sephadex konnten nur geringe Aktivitäten eluiert werden.

Als höchste Aktivität (= 100 %) wurde für Acetokinase 222 γ/ml $AcPLi_2$, für Phosphotransacetylase 90γ/ml AcCh und für Cholinacetylase 50γ/ml gefunden.

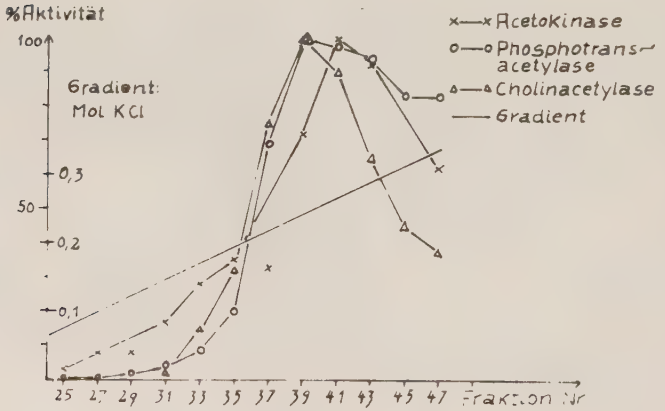


Abbildung 8

ß) Molekularsiebe.

1) Der Fraktionsschneider (Abb. 9).

Der Fraktionsschneider wurde von der Fa. LKB-PRODUKTER-AB, Stockholm, Schweden, geliefert und enthielt drei Einheiten:
LKB 3400 B RadiRac ^{R} Fraktionssammler
LKB 4701 A Uvicord Ultraviolett Absorptionsmesser
LKB 6520 A Fallbügelschreiber

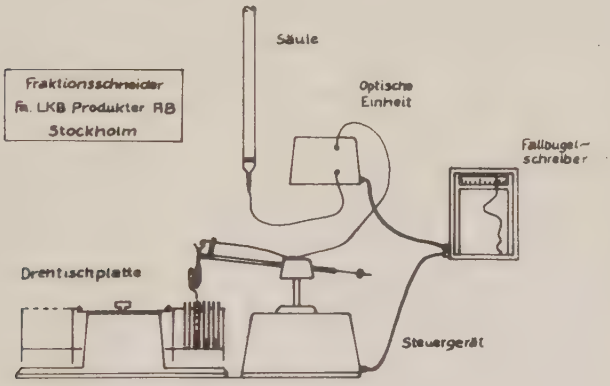


Abbildung 9

Von einer Säule läuft das Eluat durch einen Teflonschlauch von 1 mm lichter Weite in den optischen Teil des Uvicords, durch eine Durchflußküvette und von dort durch einen Silikonschlauch von 0,7 mm lichter Weite in einen Siphon, den man nach Bedarf für verschiedene Volumina zwischen 1 und 10 ml auswählen kann. Der Siphon ist an dem einen Ende einer Wippe befestigt, die sich neigt, wenn sich der Siphon füllt, und sich wieder hebt, wenn er sich entleert. Beim Neigen löst die Wippe einen Kontakt aus, der sie einen Schritt nach vorn bzw. hinten machen läßt oder die Drehtischplatte um einen bestimmten Winkel weiter-

dreht, so daß von den insgesamt 240 Röhrchen nach einem Rechteckschema immer das nächste unter dem Siphon zu stehen kommt. Die Röhrchen stehen in Ständereinheiten zu 24 Stück. Die Einheiten sind an der Drehplatte angehängt und können leicht entfernt und in den Kühlschrank gebracht werden. Der durch die Wippe ausgelöste Impuls dient gleichzeitig dazu, die Farbe im Fallbügelschreiber zu wechseln.
In der optischen Einheit wird das Licht einer Quecksilberlampe durch einen Flüssigkeitsfilter aus $NiSO_4$-Lösung, danach durch die Durchflußküvette und schließlich über ein Schwarzfilter auf eine Photozelle geleitet. Durch diese Filteranordnung wird zum Schluß nur noch eine Bande von 253,7 mμ durchgelassen. Das Volumen der Küvette beträgt 0,1 ml, die Schichtdicke 3 mm. Die an der Photozelle abgegriffene Spannung wird im Uvicord verstärkt und auf den Fallbügelschreiber gegeben.
Bei Arbeiten im Kühlraum bei $4^{\circ}C$ muß die Quecksilberlampe beheizt werden. Zu diesem Zweck liefert die Firma einen Kühlraumadapter. Dieses Gerät besteht aus einer Heizung und einem Transformator. Der Adapter wird an einen Schenkel der U.V.-Lampe geklemmt und das Kabel neben der Deckplatte hinausgeführt. Am Transformator kann das Kabel an zwei Stellen für "starke" und "schwache" Heizung angebracht werden. Unser Versuch lief mit schwacher Heizung. Der Fallbügelschreiber ist mit einer Skala von 0 bis 100 ausgerüstet, unter der ein Papierstreifen mit der gleichen Einteilung läuft. Hiermit ist ein Maß für die Durchlässigkeit gegeben, aus der die Extinktion errechnet werden muß. Die Stellungen des Zeigers für 100 und 0 werden vor dem Versuch durch Regulierung eines Spaltes hinter der U.V.-Lampe (für 100) und der Ausgangsspannung des Verstärkers (für 0 bei geschlossenem Spalt) justiert. Alle 20 Sekunden drückt ein Fallbügel den Zeiger auf ein Farbband, so daß ein Punkt auf dem Papier entsteht. Wenn die Siphon-Wippe nach unten kippt, wird das Farbband von rot nach blau oder umgekehrt gewechselt, so daß man später auf dem Registrierstreifen die Anzahl der gefüllten Röhrchen abzählen kann.

Die Geschwindigkeit des Papierstreifens ist zwischen 1, 2 und 6 cm Vorschub pro Stunde wählbar. In allen Versuchen wurde die Geschwindigkeit 2 cm pro Stunde beibehalten.

2) Methodik:

Die Säulenrohre wurden vom Glasbläser [110] angefertigt. Sie bestanden aus einem Glasrohr von 50 bzw. 100 cm Länge und 2,1 cm Durchmesser, an das eine Glassinterplatte G 1 angeschmolzen war. Unterhalb der Glassinterplatte lag bis zur Verjüngung zu einem Glasrohr von 9 mm Durchmesser ein Totvolumen von ca. 14 ml. An das Glasrohr wurde mit einem Stückchen Gummischlauch ein Glasübergang für den feinen Teflonschlauch angebracht.

Sephadex G-100 und G-200 wurden in Wasser aufgeschlemmt und dekantiert und drei Tage zum Quellen stehen gelassen. Sephadex G-75 brauchte nur über Nacht zu quellen. Dann wurde in das Säulenrohr etwas Glaspulver "grob" (Fa. Riedel-de Haën) gegeben und das über dem Sephadex stehende Wasser zugegossen. Durch Klopfen wurde der Sand noch gleichmäßig verteilt und dann wurde nach und nach das Rohr mit Sephadex gefüllt. Sobald sich das Gelbett abgesetzt hatte, konnte mit dem Einspülen des später verwendeten Phosphatpuffers begonnen werden. Nach fünfstündiger Pufferbehandlung war die Säule zur Aufnahme der Ausgangslösung bereit.

Die Ausgangslösung stellte, soweit nicht anders beschrieben, Fraktion Mc dar. Diese wurde durch Auflösen der letzten Ammonsulfatfraktion ohne Dialyse gewonnen und besaß durch den relativ hohen Salzgehalt ein hohes spezifisches Gewicht. Dadurch war es möglich, ohne zusätzliches Lösen von Rohrzucker [74], sauber zu unterschichten. Im anderen Falle wurde das Gelbett oben mit einem Wattebausch verschlossen, so daß man die Ausgangslösung und den Puffer nacheinander auftragen konnte, ohne daß die Oberfläche aufgewirbelt wurde und sich die Ausgangslösung und der Puffer vermischen konnten. Der Phosphatpuffer lief aus

einem Niveaugefäß, das aus einer umgedrehten Flasche bestand, die mit einem Glasrohr verschlossen war und damit in das Säulenrohr hineinreichte. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug normalerweise etwa 25 ml/Stde.; das entspricht 7,2 ml/Stde. und cm^2. Aufgefangen wurden Fraktionen zu 1,8 ml. Wenn nicht anders angegeben, wurde bei Zimmertemperatur gearbeitet. Nach dem Versuch wurde das Gel in einer Phenylquecksilberacetatlösung (1 : 10 000) in destilliertem Wasser aufbewahrt.

3) Die Chromatographie auf Molekularsieben:

Abbildung 10 : Vorversuch zur Trennung an Sephadex G-100.

Auf einer Sephadex G-100-Säule 2,1 x 47,5 cm wurden 3 ml Fraktion Mc durch Unterschichten aufgebracht und bei Zimmertemperatur mit Phosphatpuffer eluiert. Aufgefangen wurden 50 Fraktionen zu 1,8 ml. Als äußeres Volumen durften 54 ml = 30. Fraktion, als Gesamtvolumen 145 ml erwartet werden.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase und AcCh-Synthese mit jeweils 0,2 ml der Fraktionen. AcCh wurde chemisch bestimmt.

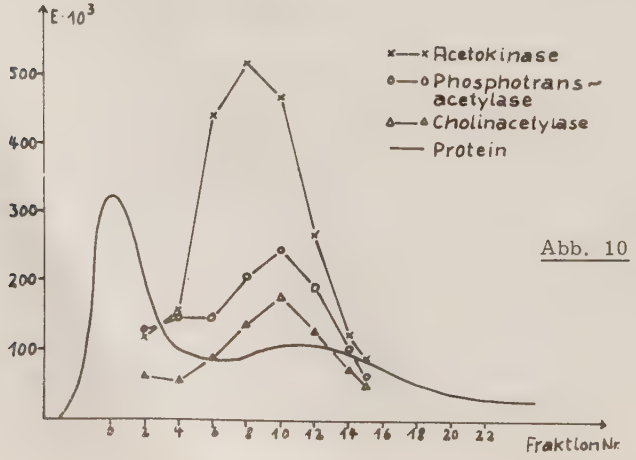


Abb. 10

Abbildung 11 : Hauptversuch zur Trennung auf Sephadex G-100.

Auf eine Sephadex G-100-Säule 2,1 x 84 cm wurden 3 ml Fraktion Mc durch Unterschichten aufgebracht und bei Zimmertemperatur mit Phosphatpuffer eluiert. Nach einem Vorlauf von 90 ml wurden 80 Fraktionen zu 1,8 ml aufgefangen. Als äußeres Volumen durften 102 ml, als Gesamtvolumen 286 ml erwartet werden. Inkubationsansätze nach A.d. für Acetokinase und AcCh-Synthese mit jeweils 0,3 ml der Fraktionen. AcCh wurde chemisch bestimmt.

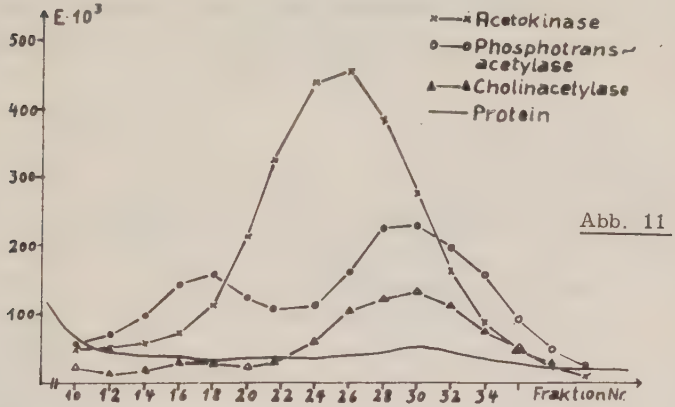


Abb. 11

Abbildung 12 : Zweifache Trennung auf Sephadex G-100; Gewinnung von Bienenacetokinase, Bienenphosphotransacetylase I, Fraktion Phosphotransacetylase II + Cholinacetylase.

Die Fraktionen 11 - 19, 20 - 25 und 26 - 38 der Abbildung 11 aus insgesamt drei Versuchen wurden vereinigt und lieferten 27 ml Fraktion I, 16 ml Fraktion II und 37 ml Fraktion III. Das Protein der Fraktionen wurde mit 50 % g/V Ammonsulfat gefällt und die Niederschläge wurden in je 3,5 ml Extraktionslösung gelöst. 3 ml jeder Fraktion wurden wie

in Abbildung 11 chromatographiert und die Enzymaktivität bestimmt. Die eluierten Fraktionen 28 - 32 der Fraktion II wurden vereinigt und lieferten Bienenacetokinase.

Die eluierten Fraktionen 21 - 35 der Fraktion I wurden vereinigt und lieferten Bienenphosphotransacetylase I.

Die eluierten Fraktionen 35 - 39 der Fraktion III wurden vereinigt und lieferten die Fraktion Phosphotransacetylase II + Cholinacetylase.

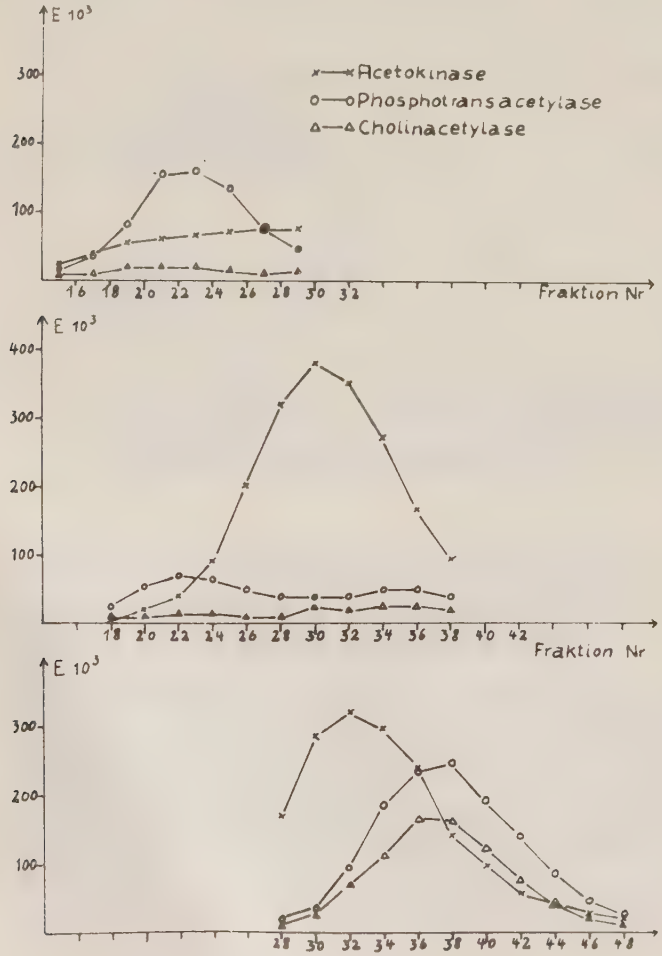


Abbildung 12

Abbildung 13 : Trennung einer Sephadex G-100-Fraktion auf Sephadex G-200.

Die Fraktionen 7-14 der Abbildung 10 wurden vereinigt und die 12 ml Lösung mit 6 g Ammonsulfat versetzt. Der Niederschlag wurde in 3 ml Extraktionslösung gelöst und 2,5 ml wurden auf eine Sephadex G-200-Säule 2,1 x 47,5 cm durch Unterschichten aufgebracht. Eluiert wurde bei Zimmertemperatur mit Phosphatpuffer, und es wurden 65 Fraktionen zu 1,8 ml aufgefangen. Als äußeres Volumen durften 45 ml = 35. Fraktion, als Gesamtvolumen 155 ml erwartet werden.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase und AcCh-Synthese mit jeweils 0,5 ml der Fraktionen. AcCh wurde chemisch bestimmt.

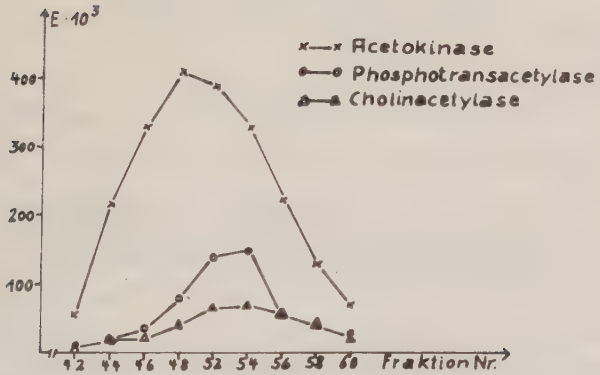


Abbildung 13

Abbildung 14 : Trennung über Molekularsieb und Ionenaustauscher.

Die Fraktionen 24-36 von Abbildung 11 wurden vereinigt und von den 22,5 ml Lösung 18,5 ml auf eine Säule aus 2,0 g vorbehandelte DEAE-Cellulose [64] gebracht und wie in Abbildung 6 eluiert und wie in Tabelle 22 inkubiert.

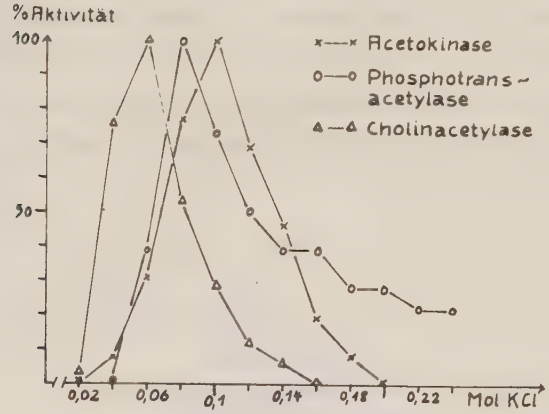


Abb. 14

4) "Zone Precipitation":

4 g Sephadex G-75 ließ man in Extraktionslösung, versetzt mit 50 % g/V Ammonsulfat, über Nacht quellen und füllte in ein Säulenrohr 1,5 x 20 cm, das mit Glaswolle verschlossen war. Nach dem Absetzen des Gelbettes wurde eine Ammonsulfat-Suspension (50 % g/V) des Enzyms aufgebracht. Nach dem Einsickern wurde der Gradientenmischer (C. b. α. 2.) angeschlossen, dessen Flasche A mit 40 ml Extraktionslösung, versetzt mit 50 % g/V Ammonsulfat, und dessen Flasche B mit 40 ml Extraktionslösung gefüllt war. Dadurch wurde mit einem linearen Gradienten von 50 - 0 % Ammonsulfat eluiert. Die Extinktion des Eluats wurde im Uvikord gemessen und das Eluat im Fraktionsschneider in 1,8-ml-Fraktionen aufgefangen.

Abbildung 15 : Modellversuch mit der Fliegenfraktion B [13].

Zur Trennung wurden 2 ml der Ammonsulfatsuspension der auf 1/10 ihres Ausgangsvolumens mit Ammonsulfat konzentrierten Fraktion B (Überstand der Säurefällung) verwendet.
Inkubationsbedingungen nach A. d. für AcCh-Synthese. AcCh wurde chemisch bestimmt.

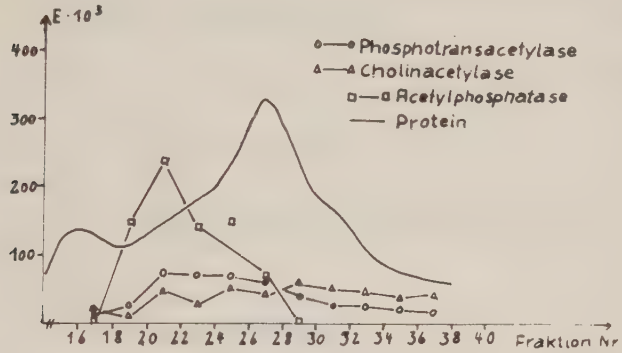


Abb. 15

Abbildung 16 : Versuch mit der Bienenfraktion Mc.

Zur Trennung wurden 2 ml der Ammonsulfat-Suspension von Fraktion Mc verwendet.
Inkubationsbedingungen wie in Abbildung 11.

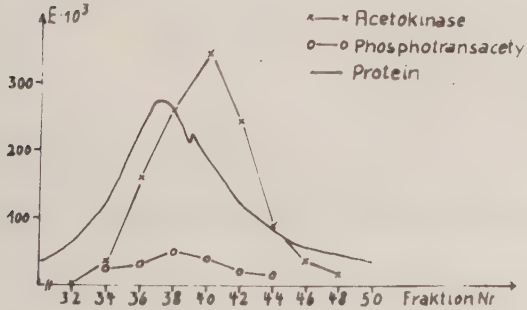


Abb. 16

Abbildung 17 : Versuch mit der Bienenfraktion Mc auf Sephadex G-100.

Auf einer Sephadex G-100-Säule 2,1 x 43,5 cm wurde, wie in Abbildung 16 beschrieben, verfahren. Nach der Gradientenelution wurde mit Phosphatpuffer weiter eluiert.
Inkubationsbedingungen wie in Abbildung 13.

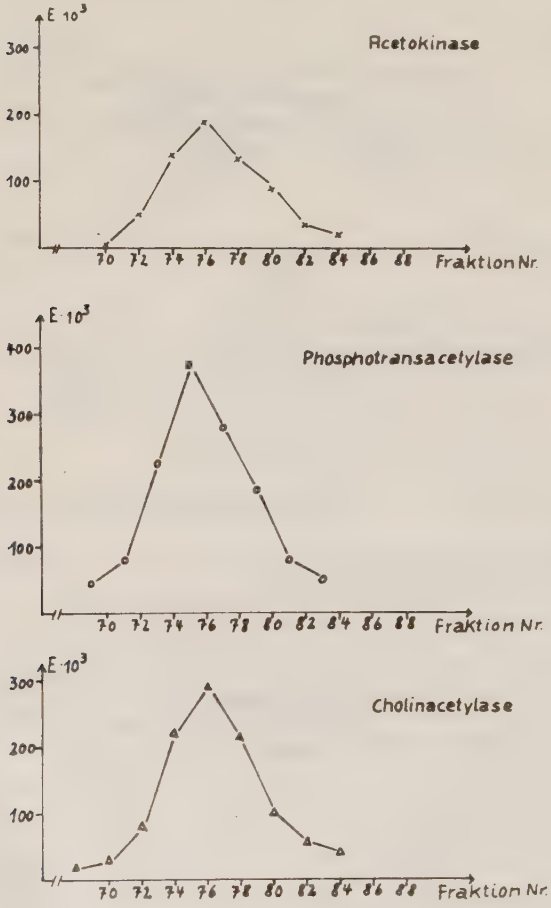


Abbildung 17

D) Eigenschaften der gereinigten Enzyme

a) Acetokinase

. α) Ionenbedürfnis:

Tabelle 28. Zweiwertige Kationen.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase ohne Mangan mit 0, 2 ml Bienenacetokinase (Abbildung 12).

Zusätze/ml	γAcPLi$_2$/ml
-	15
0, 025 mg = 12 µMol $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	48
0, 052 mg = 26 µMol "	89
0, 075 mg = 38 µMol "	133
0, 125 mg = 63 µMol "	180
0, 177 mg = 89 µMol "	240
0, 250 mg = 126 µMol "	252
0, 327 mg = 165 µMol "	260
0, 2 mg = 126 µMol $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	126
0, 2 mg = 90 µMol $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	7
0, 2 mg = 150 µMol $ZnCl_2$	48
0, 2 mg = 110 µMol $CdCl_2$	18

Tabelle 29. Einfluß zweiwertiger Kationen neben Mangan.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase mit 0, 1 ml Fraktion Mb.

Zusätze/	γAcPLi$_2$/ml
-	630
0, 1 mg/ml $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	620
0, 1 mg/ml $ZnCl_2$	500
0, 1 mg/ml $CdCl_2$	570

Tabelle 30. Einwertige Kationen.

Die Inkubationsansätze enthielten im ml 1 mg Cystein · HCl, 0,2 mg $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$, 0,1 ml einer mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan neutralisierten 1n Essigsäure, 0,05 ml einer mit Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan neutralisierten 20 proz. Hydroxylamin · HCl-Lösung, 1 mg $ATPNa_2 \cdot 4\ H_2O$ und 0,05 ml dialysierter Bienenacetokinase. Dialysiert wurde 1 ml Bienenacetokinase 3 Stdn. bei $4^{\circ}C$ gegen 2 Liter destilliertes Wasser. Inkubationsbedingungen nach A. d. für Acetokinase.

Zusätze	$\gamma AcPLi_2$/ml
-	77
7,5 mg/ml KCl	70
5,8 mg/ml NaCl	70
5,4 mg/ml NH_4Cl	70

Tabelle 31. Carbonsäurespezifität.

Inkubationsbedingungen nach A. d. für Acetokinase ohne Kaliumacetat mit 0,05 ml Fraktion Mb.

Zusätze	$\gamma AcPLi_2$/ml
0,1 Mol/ml Kaliumacetat	265
0,1 Mol/ml Natriumpropionat	63
0,1 Mol/ml Natriumbutyrat	33
0,1 Mol/ml Kaliumlaktat	48

Tabelle 32. Arsenit- und Arsenationen.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase mit 0,2 ml Bienenacetokinase.

Zusätze	$\gamma AcPLi_2$/ml
-	245
1 mg/ml $NaAsO_2$	220
1 mg/ml $Na_2AsO_4 \cdot 7\ H_2O$	220

ß) p_H-Abhängigkeit:

Abbildung 18 : p_H-Abhängigkeit.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase mit 0, 1 ml Bienenacetokinase. Der p_H der einzelnen Röhrchen wurde mit 0, 1 n HCl bzw. 0, 1 n KOH eingestellt.

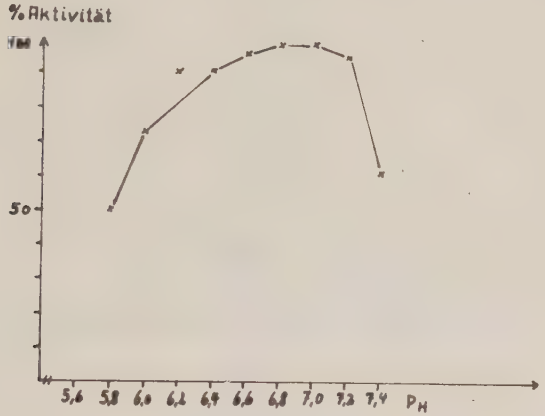


Abb. 18

γ) Reaktionskinetik:

Tabelle 33. Rückreaktion.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase ohne ATP und Hydroxylamin, jedoch mit 2 mg $AcPLi_2$ und 1 ml Bienenacetokinase. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde das verbleibende $AcPLi_2$ nach A. b. α. bestimmt.

Zusätze	γ$AcPLi_2$/ml gefunden nach: 2 Stdn.	4, 5 Stdn.	8 Stdn.
-	475	470	375
1 mg/ml $ADPNa_3$	475	390	285
enzymatisch abgebautes $AcPLi_2$ γ/ml	0	89	92
berechnete Menge verbrauchte $ADPNa_3$ γ/ml	0	300	300

Tabelle 34. Abhängigkeit der AcP-Bildung von der Inkubationszeit.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase. Die Bienenacetokinase enthielt etwa 1 mg Protein pro ml. Der Ansatz enthielt 0,1 mg Protein pro ml. Inkubationszeit wie unten angegeben.

Inkubationszeit in Stdn.	$E \cdot 10^3$	$\gamma AcPLi_2$/ml
0,5	85	63
1	165	122
2	335	248
4	400	296
6	660	485
9	925	685
23	1200	890

Die Aktivität errechnet sich aus diesem Beispiel zu

1,19 mg $AcPLi_2$/mg Protein x Stde.

$6,7 \cdot 10^3$ µMol AcP / g Protein x Stde.

Abbildung 19 : Graphische Darstellung der Tabelle 34.

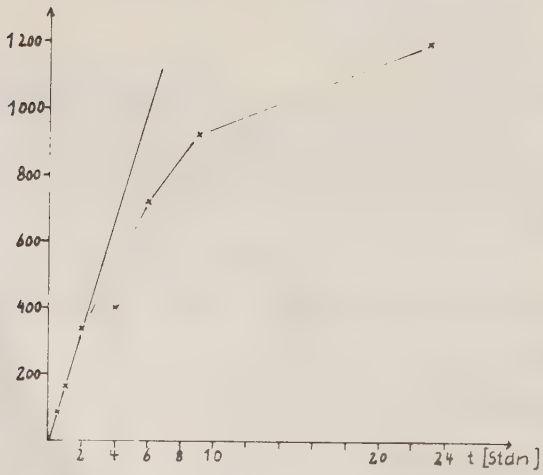


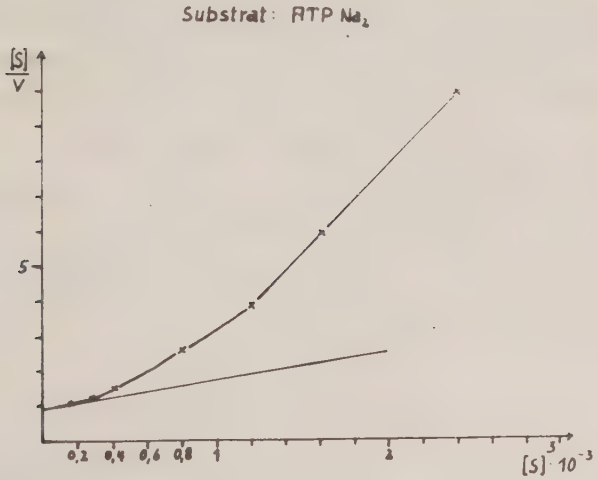
Abbildung 19

Tabelle 35. Abhängigkeit der AcP-Bildung von der ATP-Konzentration.

Inkubationsansätze nach A. d. für Acetokinase ohne ATP. Inkubationszeit wie unten angegeben.

Zusatz mg	ATPNa_2/ml [Mol] = [S]	Reaktionszeit t [Min]	$E \cdot 10^3$	γAcPLi_2/ml	$v = \frac{E \cdot 10^3}{t}$	$\frac{[S]}{v}$
0,01	$0,161 \cdot 10^{-3}$	225	35	26	0,15	1,04
0,015	$0,241 \cdot 10^{-3}$	225	50	37	0,22	1,09
0,025	$0,402 \cdot 10^{-3}$	210	55	41	0,26	1,53
0,05	$0,805 \cdot 10^{-3}$	210	65	48	0,31	2,6
0,075	$1,2 \cdot 10^{-3}$	210	65	48	0,31	3,88
0,1	$1,61 \cdot 10^{-3}$	210	55	41	0,26	6,15
0,15	$2,41 \cdot 10^{-3}$	210	50	37	0,24	10,1

Abbildung 20 : Graphische Darstellung der Tabelle 35.



δ) Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten[90, 89] für ATP als Substrat.

Tabelle 35 zeigt, daß mit hohen ATP-Konzentrationen eine Substrathemmung eintritt. Daher wird die Michaelis-Menten-Konstante nach H. L i n e w e a v e r und D. B u r k [89] ermittelt, wie es für Enzyme mit Substrathemmung vorgeschlagen wird:

1) Es wird ein Zeitpunkt t ermittelt, in welchem die gebildete Menge AcP der Inkubationszeit noch proportional ist (Abbildung 19).
2) Es wird im Zeitpunkt t (210-225 Min.) die AcP-Bildung in Abhängigkeit verschiedener ATP-Konzentrationen untersucht und aus den Ergebnissen werden die folgenden Quotienten berechnet (Tabelle 35):

$$\text{Reaktionsgeschwindigkeit} \quad v = \frac{\text{Extinktion} \cdot 10^3}{\text{Reaktionszeit}}$$

$$\frac{\text{Substratkonzentration}}{\text{Reaktionsgeschwindigkeit}} = \frac{[S]}{v}$$

3) Es wird auf Millimeterpapier das Diagramm mit $[S]$ auf der x-Achse gegen $\frac{[S]}{v}$ auf der y-Achse gezeichnet (Abbildung 20).
4) Im Punkt $[S] = 0$ wird die Tangente an die Kurve angelegt und deren Steigung

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\frac{[S]}{v}}{[S]} = \frac{1}{v_{max}}$$

berechnet; der Kehrwert stellt v_{max} dar.

Für $[S] = 1,36 \cdot 10^{-3}$ wird $\frac{[S]}{v} = 1,1 \cdot 10^6$ gefunden.

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1}{v_{max}} = \frac{1,1 \cdot 10^6}{1,36 \cdot 10^{-3}} = \frac{1}{1,24} \cdot 10^9$$

$$v_{max} = 1,24 \cdot 10^{-9} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{Min.}}\right]$$

5) In Abbildung 20 wird für $[S] = 0$ auf der y-Achse der dazugehörige Wert $\frac{[S]}{v}$ abgelesen: $\frac{[S_o]}{v_o} = 0,9 \cdot 10^6$.

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$K_m = \frac{[S_o]}{v_o} \cdot v_{max} \quad [\text{Mol}]$$

$$K_m = (0,9 \cdot 10^{6}) \cdot (1,24 \cdot 10^{-9}) = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ Mol ATP}$$

b) Phosphotransacetylase I

α) Reaktionskinetik:

Abbildung 21 : Die Bestimmung von AcCoA durch Messen der Extinktionsänderung bei 240 mμ [11, 92]

Die mit 0,1 n KOH auf p_H 6,8 eingestellten Inkubationsansätze enthielten im ml : 1 mg Cystein · HCl, 2 mg $AcPLi_2$ (77 proz.), 9,8 mg Kaliumacetat, 0,1 mg CoA und die in der Abbildung angegebenen Mengen Enzymfraktion.
Inkubiert wurde bei Zimmertemperatur (22°C) in einer 1-cm-Quarzküvette die angegebenen Zeiten.
Gemessen wurden im ZEISS-Spektralphotometer PMQ II die Extinktionen bei 240 mμ zu Beginn und während des Versuchs und aufgetragen wurden die Extinktionsänderungen gegen die Zeit.

Es bedeuten Kurve I : 0,05 ml Bakterienfraktion B_2 (Abschnitt E [45])
Kurve II : 0,1 ml " "
Kurve III : 0,15 ml " "
Kurve IV : 0,1 ml Bienenphosphotransacetylase I

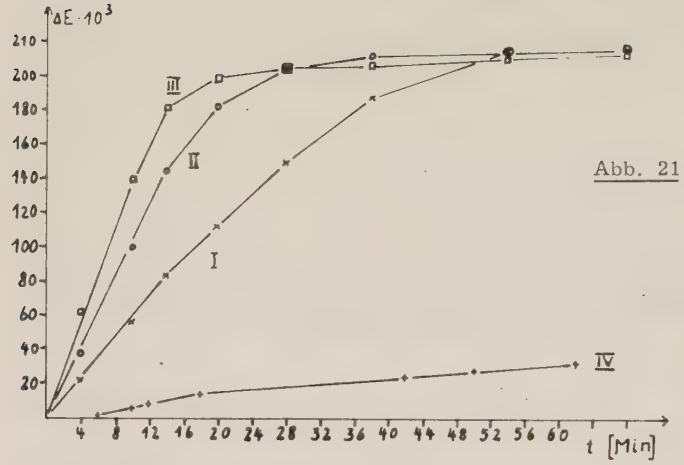


Abb. 21

Abbildung 22 : Abhängigkeit der AcCoA-Bildung von der CoA-Konzentration und der Zeit.

Inkubationsansätze wie in Abbildung 21 ohne CoA und mit 0,1 ml Bienenphosphotransacetylase I.

Es bedeuten: Kurve I : 0,033 mg/ml = $0,0435 \cdot 10^{-3}$ Mol CoA
Kurve II : 0,050 mg/ml = $0,0653 \cdot 10^{-3}$ Mol CoA
Kurve III : 0,10 mg/ml = $0,13 \cdot 10^{-3}$ Mol CoA
Kurve IV : 0,20 mg/ml = $0,26 \cdot 10^{-3}$ Mol CoA

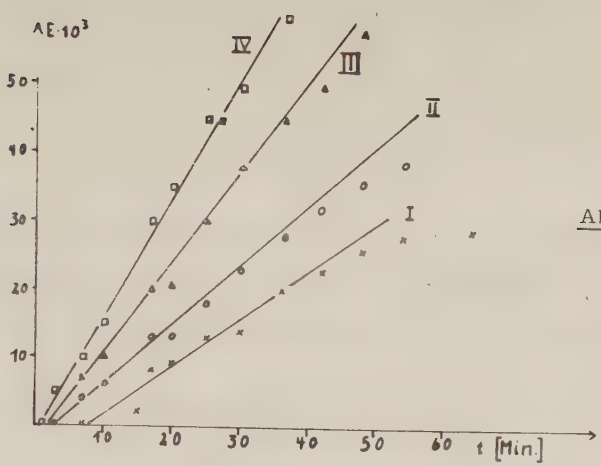


Abb. 22

Abbildung 23 : Abhängigkeit der AcCoA-Bildung von der $AcPLi_2$-Konzentration.

Inkubationsansätze wie in Abbildung 21 ohne $AcPLi_2$ und mit 0,1 ml Bienenphosphotransacetylase I.

Es bedeuten: Kurve I : 0,5 mg/ml = $0,043 \cdot 10^{-3}$ Mol $AcPLi_2$
Kurve II : 1 mg/ml = $0,086 \cdot 10^{-3}$ Mol $AcPLi_2$
Kurve III : 2 mg/ml = $0,173 \cdot 10^{-3}$ Mol $AcPLi_2$

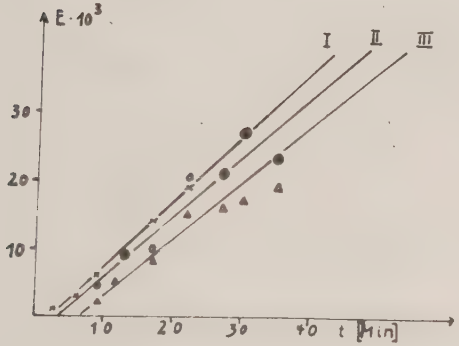


Abb. 23

ß) Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für Coenzym A als Substrat.

Abbildung 22 zeigt, daß mit CoA keine Substrathemmung eintritt. Daher konnte die Michaelis-Menten-Konstante nach H. L i n e w e a v e r und D. B u r k [89] für Enzyme ohne Substrathemmung ermittelt werden:

1) Aus Abbildung 22 wird die Reaktionsgeschwindigkeit $v \left[\frac{\text{Mol}}{\text{Min}}\right] \hat{=} \text{tg}\,\alpha = \frac{\Delta \text{ Extinktion} \cdot 10^3}{\Delta \text{ Reaktionszeit}}$ ermittelt. Dieses Verfahren gestattet die Bestimmung auch in Enzymsystemen mit Accellerationsphase.
Ferner werden aus der CoA-Konzentration $[\text{Mol}] = [S]$ und der gefundenen Reaktionsgeschwindigkeit v die reziproken Werte $\frac{1}{[S]}$ und $\frac{1}{v}$ gebildet.

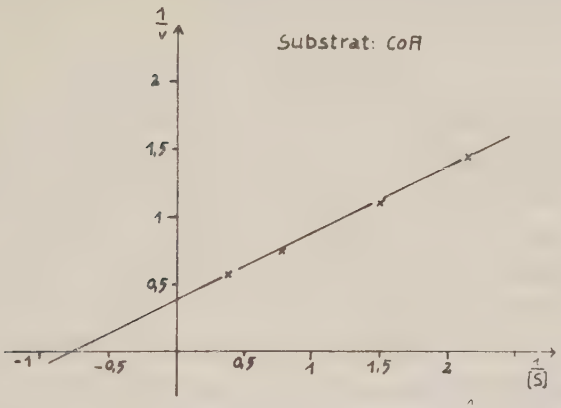
$[S]$	$\frac{1}{[S]}$	$v = \text{tg}\,\alpha$	$\frac{1}{v}$
$4,35 \cdot 10^{-3}$	$23 \cdot 10^3$	0,7	1,43
$6,53 \cdot 10^{-3}$	$15,3 \cdot 10^3$	0,88	1,13
$13,0 \cdot 10^{-3}$	$7,67 \cdot 10^3$	1,34	0,75
$26,0 \cdot 10^{-3}$	$3,83 \cdot 10^3$	1,74	0,57

2) Es wird auf Millimeterpapier das Diagramm mit $\frac{1}{[S]}$ auf der x-Achse gegen $\frac{1}{v}$ auf der y-Achse abgetragen: Abbildung 24.

3) Im Punkt $\frac{1}{v} = 0$ wird auf der negativen x-Achse $\frac{1}{[S]}$ abgelesen, der gefundene Wert $(-0,75 \cdot 10^4)$ mit -1 multipliziert. Der Kehrwert stellt die gesuchte Michaelis-Menten-Konstante K_m $[\text{Mol}]$ dar.

$$K_m = 1,3 \cdot 10^{-4} \text{ Mol CoA}$$

Abbildung 24 : Graphische Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für CoA als Substrat.



c) Acetylcholinsynthese aus Acetylphosphat.

Tabelle 36. Inkubationsbedingungen.

Die mit 0,1 n KOH auf p_H 6,8 eingestellten 2-ml-Inkubationsansätze enthielten im ml : 1 mg $AcPLi_2$, 0,2 mg $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, 1 mg Cholinchlorid, 0,1 mg CoA und 0,1 ml dialysierte Fraktion Mb. Inkubationsbedingungen wie in A.d. beschrieben. AcCh wurde biologisch bestimmt.

Zusätze:

9,8	mg/ml Kaliumacetat	+	-	+	+	+
9,8	mg/ml Natriumacetat	-	+	-	-	-
0,25	mg/ml Prostigmin	+	+	-	+	+
1	mg/ml Glutathion	+	+	+	-	-
1	mg/ml Cystein · HCl	-	-	-	+	-
γAcCh/ml gefunden:		115	52	75	110	100

Tabelle 37. Zweiwertige Kationen, Einfluß von Arsenverbindungen.

Inkubationsansätze nach A. d. für AcCh-Synthese ohne Mg^{++} und 0, 2 ml der Fraktion Phosphotransacetylase II + Cholinacetylase (Abbildung 12). AcCh wurde biologisch bestimmt.

Zusätze:								
0, 25 mg/ml $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	+	-	-	-	-	-	-	-
0, 2 mg/ml $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	-	+	-	-	-	-	-	-
0, 2 mg/ml $CaCl_2 \cdot 6H_2O$	-	-	+	-	-	-	-	-
0, 3 mg/ml $ZnCl_2$	-	-	-	+	-	-	-	-
0, 2 mg/ml $CdCl_2$	-	-	-	-	+	-	-	-
1 mg/ml $NaAsO_2$	-	-	-	-	-	+	-	-
1 mg/ml $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	-	-	-	-	+	-
γ AcCh/ml gefunden:	51	51	42	12	73	10	21	40

Tabelle 38. Arsenolyse von Phosphotransacetylase I und II.

Inkubationsansätze nach A. d. für AcCh-Synthese ohne Cholin und ohne CoA und mit 2 mg $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ (Natrium arsenicicum puriss. Erg. B. 6 der Fa. E. MERCK) und 0, 05 ml der Fraktion Mc. Inkubationszeit 5 Stdn. Am Schluß der Inkubation wurde das enzymatisch nicht hydrolysierte $AcPLi_2$ nach A. b. α. bestimmt.

Zusätze:	enzymatisch abgebautes $AcPLi_2$ in %
--	16
0, 1 mg/ml CoA	13

E) Trennung von Milchsäurebakterien-Enzymen an Molekularsieben.

Aus acetongetrockneten Bakterien (Streptobacterium plantarum 10S) wurden die Fraktionen A_{10} und B_2 [45] durch Säurefällung und Ammonsulfatfraktionierung hergestellt. Die Fraktionen wurden in 1/10 ihres Extraktvolumens in Extraktionslösung gelöst.

Tabelle 39. Versuch mit Fraktion B_2 an Sephadex G-200; Fraktion B_2S.

Auf eine Sephadex G-200-Säule 2,1 x 45 cm wurden 3 ml Fraktion B_2 aufgebracht und bei Zimmertemperatur mit destilliertem Wasser eluiert. Nach einem Vorlauf von 41 ml wurden 70 Fraktionen zu 1,8 ml aufgefangen. Als äußeres Volumen durften 42 ml, als Gesamtvolumen 156 ml erwartet werden. Inkubationsansätze nach A.d. für AcCh-Synthese, aber ohne Zusatz von b_{14} für Cholinacetylase; für Arsenolyse ohne Cholin unter Zusatz von 1 mg/ml $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$. AcCh wurde chemisch, der enzymatische Abbau von $AcPLi_2$ nach fünfstündiger Inkubation wie in Tabelle 10 bestimmt. Pro Ansatz wurden 0,3 ml der Fraktionen eingesetzt.

Die Röhrchen 8-14 wurden vereinigt zu einer cholinacetylasefreien Bakterienphosphotransacetylase mit der Bezeichnung B_2S.

Fraktion Nr.	Phosphotransacetylase γAcCh/ml	durch Arsenolyse enzymatisch abgebautes $AcPLi_2$ in %	Cholinacetylase γAcCh/ml
6	23	0	0
8	173	0	10
10	228	96	13
12	213	100	15
14	190	100	13
16	250	100	33
18		95	
20		30	

Abbildung 25 : Versuch mit Fraktion B_2 an Sephadex G-200.

Versuchsbedingungen der Chromatographie wie in Tabelle 25. Inkubationsbedingungen wie in Tabelle 25 mit 0,05 ml Fraktion B_2S für die Prüfung der Cholinacetylaseaktivität.

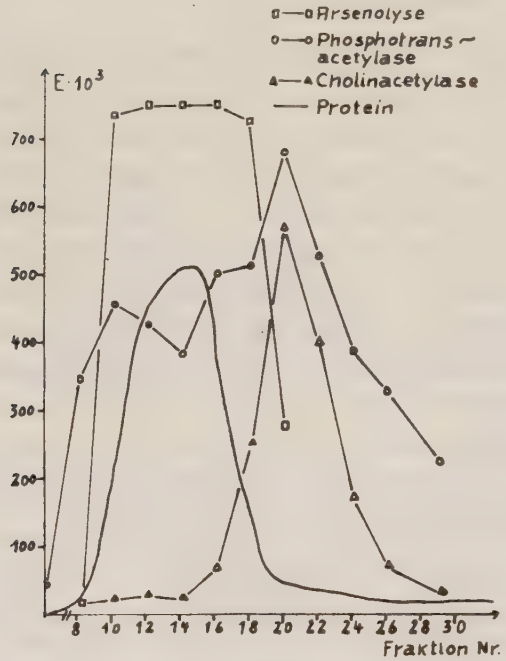


Abb. 25

Abbildung 26 : Versuch mit Fraktion B_2 an Sephadex G-100.

Auf eine Sephadex G-100-Säule 2,1 x 95,5 wurden 3 ml Fraktion B_2 gegeben und bei Zimmertemperatur mit destilliertem Wasser eluiert. Nach einem Vorlauf von 94 ml wurden 65 Fraktionen zu 1,8 ml aufgefangen. Als äußeres Volumen durften 117 ml, als Gesamtvolumen 330 ml erwartet werden. Inkubationsbedingungen wie in Abbildung 25.

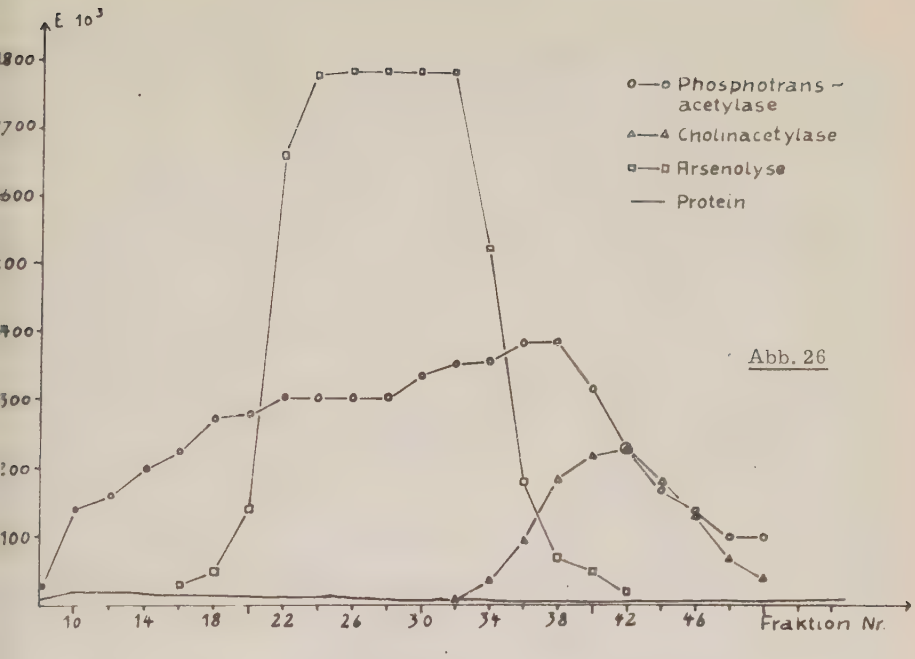


Abb. 26

Abbildung 27 : Versuch mit Fraktion A_{10} an Sephadex G-100.

Auf eine Sephadex G-100-Säule 2,1 x 98 cm wurden 3 ml Fraktion A_{10} aufgebracht und bei Zimmertemperatur mit Phosphatpuffer eluiert. Nach einem Vorlauf von 94 ml wurden 65 Fraktionen zu 1,8 ml aufgefangen. Als äußeres Volumen durften 120 ml, als Gesamtvolumen 340 ml erwartet werden. Inkubationsansätze nach A.d. für Acetokinase und Phosphotransacetylase, nach Tabelle 8 für Myokinase und nach Tabelle 39 für Arsenolyse mit jeweils 0,3 ml der Fraktionen. AcCh wurde chemisch bestimmt.

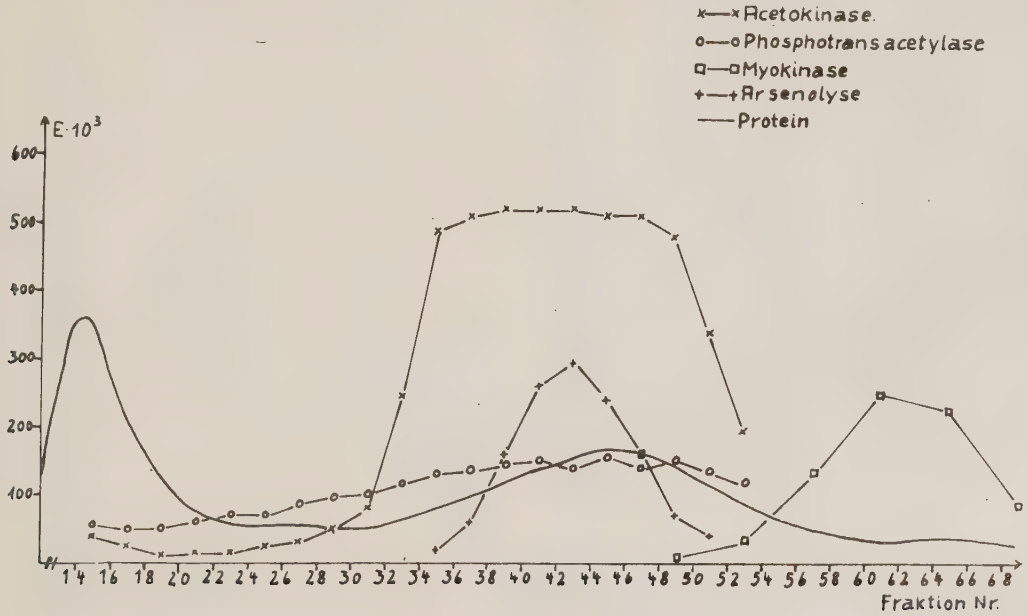


Abbildung 27

Abbildung 28 : K^+-Bedürftigkeit der Bakterien-Phosphotransacetylase aus Fraktion A_{10}.

Auf eine Sephadex G-100-Säule 2,1 x 93 cm wurden 3 ml Fraktion A_{10} aufgebracht und bei Zimmertemperatur mit 0,02 mol Tris-Puffer eluiert (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 2,42 g/l mit 90 proz. Phosphorsäure auf p_H 6,8 gebracht). Nach einem Vorlauf von 105 ml wurden 60 Fraktionen zu 1,8 ml aufgefangen. Als äußeres Volumen durften 114 ml, als Gesamtvolumen 320 ml erwartet werden. Inkubationsansätze für Phosphotransacetylase nach A. d. mit jeweils 0,3 ml der Fraktionen (Kurve I).

Anstelle von Kaliumacetat wurde für Kurve II Tris-Acetat (12,1 mg/ml Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan mit Essigsäure auf p_H 6,8 gebracht). Inkubationsansätze für Arsenolyse nach Tabelle 39.

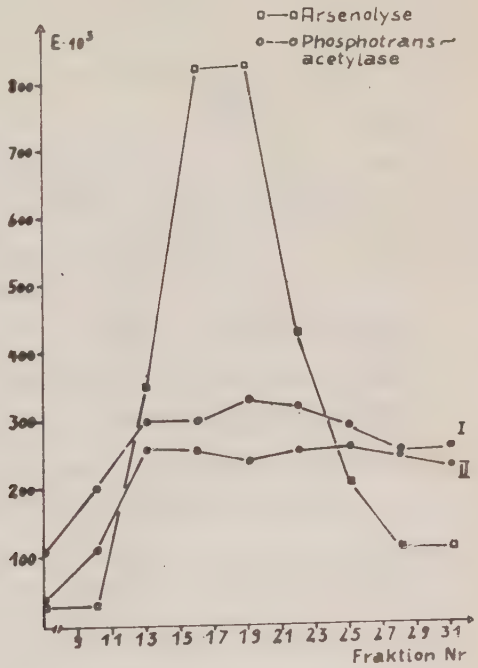


Abbildung 28

Literaturverzeichnis

1) O. Loewi, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 189, 239 (1921), cit. nach Lit. 9).

2) H.H. Dale, J. Physiology 48, 3 (1914).

3) Z.M. Bacq, Bull. Cl. Sci. Acad. roy. Belgique 24, 545 (1938) [C] (C. 109 II, 3256 (1938)).

4) N. Emmelin und W. Feldberg, J. Physiology 106, 440 (1947) (C.A. 106, 2651 b (1948)).

5) P.J. Mathias und C.W. Sheppard, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 86, 69 (1954) (Ber. ges. Physiol. exp. Pharmacol. 173, 117 (1955)).

6) W. Neumann und E. Habermann, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 212, 163 (1950).

7) S. Korkes, A. Campello, S.R. Korey, Joseph R. Stern, D. Nachmansohn, S. Ochoa, J. biol. Chemistry 198, 215 (1952).

8) F. Lipmann, M.E. Jones, S. Black und R.M. Flynn, J. Amer. chem. Soc. 74, 2384 (1952).

9) Zusammenfassung: M. Guggenheim, Die biogenen Amine, S. Karger Verlag, Basel 1951 S. 148 ff.

10) D. Nachmansohn und A.L. Machado, J. Neurophysiology 6, 397 (1943).

11) Zusammenfassung: K. Decker, Die Aktivierte Essigsäure, Ferd. Enke Verlag, Stuttgart 1959 S. 110-162.

12) F. Lipmann, J. biol. Chemistry 155, 55 (1944).

13) O. Dann und A. Roth, Liebigs Ann. Chem. 612, 34 (1958).

14) H. Sucker, Liebigs Ann. Chem. 683, 225 (1965).

15) H. Sucker, Liebigs Ann. Chem. 683, 239 (1965).

16) S.P. Colowick und H.M. Kalckar, J. biol. Chemistry 148, 117 (1943).

17) Zusammenfassung: L. Noda in P.D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck, The Enzymes, Academic Press, Inc., New York, London, 2. Auflage 1962, Band 6, S. 139-147.

18) O. Dann und H. Sucker, Liebigs Ann. Chem. 601, 216 (1956).

19) E.R. Stadtman und H.A. Barker, J. biol. Chemistry 184, 769 (1950).

20) E.R. Stadtman, J. biol. Chemistry 196, 527 (1952).

21) E.R. Stadtman, G.D. Novelli und F. Lipmann, J. biol. Chemistry 191, 365 (1951).

22) J.E. Varner, D.H. Sclocum und G.C. Webster, Arch. Biochem. Biophysics 73, 508 (1958). (C.A. 52, 10252 e (1958)).

23) G. Kuschinsky und H. Lyllmann, Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964.

24) M.J. Bleiberg, M. Cefaratti, N. Klinman und P. Kornblith, Toxicol. Appl. Pharmacol. 4, 292 (1962) (C.A. 57, 4977 g (1962)).

25) O. Dann und H. Sucker, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 295, 497 (1962).

26) A. Wacker, A. Roth, H. Sucker und O. Dann, Liebigs Ann. Chem. 601, 202 (1956).

27) H. Sucker, Dissertation Erlangen 1955.

28) A. Roth, Dissertation Erlangen 1956.

29) F. Lipmann und L.C. Tuttle, J. biol. Chemistry 159, 21 (1945).

30) I.A. Rose, M. Grunberg-Manago, S.R. Corey und S. Ochoa, J. biol. Chemistry 211, 737 (1954).

31) H. Führer, Biochem. Z. 92, 347 (1918).

32) S. Hestrin, J. biol. Chemistry 180, 249 (1949).

33) K. Doerffel, Beurteilung von Analysenverfahren und -ergebnissen, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1964, S. 14.

34) T.E. Weichselbaum, Amer. J. Clin. Pathol. 16, Techn. Sec. 10, 40 (1946), zit. nach Lit. 39).

35) A.G. Gornall, C.I. Bardawill und M.M. David, J. biol. Chemistry 177, 751 (1949).

36) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

37) O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z.
a) 303, 40 (1939)
b) 310, 384 (1941)

38) O. Folin und A.V. Ciocalteu, J. biol. Chemistry 73, 627 (1927) zit. nach Lit. 99).

39) D. Glässer und R. Kleine, Pharmazie 17, 32 (1962).

40) Herrn Dr. R. Dittmeyer, Erlangen, Universitäts-Frauenklinik, danken wir sehr herzlich für die Überlassung dieser Probe.

41) S. Udenfriend, Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Academic Press, London, New York 1962, S. 206 ff.

42) V.G. Shore und A.B. Pardee, Arch. Biochem. Biophysics 60, 100 (1956).

43) W. Feldberg und T. Mann, J. Physiol. 103, 28-9P (1944) (C.A. 39, 972[1] (1945)).

44) D. Nachmansohn und H.M. John, J. biol. Chemistry 158, 157 (1945).

45) H. Sucker, Liebigs Ann. Chem. 642, 207 (1961).

46) D.D. Hoskins, V.H. Cheldelin und R.W. Newburgh, J. gen. Physiol. 39, 705 (1956). (C.A. 51, 622 g (1957)).

47) Übersicht: W.W. Kielley in P.D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck: The Enzymes, Academic Press, Inc., New York, London 1961, Band 5, S. 149 ff.

48) Übersicht: W.W. Kielley, Ann. Rev. Biochem. 33, 403 (1964).

49) W. Hasselbach, Arzneimittel-Forsch. 12, 877 (1962).

50) E. Zebe und H. Falk, Z. Naturforsch. 18b, 501 (1963).

51) Koscak Maruyama und Shoichi F. Sakagami, Z. vergleich. Physiol. 40, 543 (1953). (C.A. 56, 3932a (1962)).

52) O. Dann, K.J. Bamberg und H. Sucker, Unveröffentlichte Versuche.

53) E. Bauer in E. Bamann und K. Myrbäck: Die Methoden der Ferment-Forschung, Thieme-Verlag, Leipzig 1941, S. 1426 ff.

54) H. Kumagai und S. Ebashi, Nature London 173, 871 (1953).

55) F. Leuthardt, Lehrbuch der Physiologischen Chemie, Walter de Gruyter & Co., Berlin 1963, S. 181.

56) P. Jollès, Angew. Chemie 76, 20 (1964).

57) S.P. Colowick und H.M. Kalckar, J. biol. Chemistry 148, 117 (1943).

58) F. Turba, Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1954, S. 294 ff.

59) Sephadex R, Hersteller: Pharmacia, Uppsala, Schweden.

60) A. Tiselius, Experientia [Basel] 17, 433 (1961).

61) J. Porath und E.B. Lindner, Nature [London] 191, 69 (1961).

62) K. Dorfner, Ionenaustauscher, Walter de Gruyter & Co., Berlin 1964.

63) Prospektmaterial der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

64) Von der Firma Schleicher & Schüll freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

65) E.A. Peterson und H.A. Sorber, J.Amer.chem.Soc. 78, 751 (1956).

66) K. Dorfner, Chemiker-Ztg. 87, 871 (1963).

67) E.A. Scheuermann, Chemiker-Ztg. 85, 767 (1961).

68) J. Porath und P. Flodin, Nature [London] 183, 1657 (1959).

69) M. Stacey und C.R. Ricketts in L. Zechmeister: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Springer Verlag, Wien 1951, Band 8, S. 28 ff.

70) P. Flodin, Dissertation Uppsala 1962.

71) D.J. Lea und A.H. Sehon, Canad. J.Chem. 40, 159 (1962) (C.A. 56, 8042 f (1962)).

72) Lieferant: CALBIOCHEM A.G., Luzern, Löwengraben 14.

73) H.G. Boman und S. Hjerten, Arch. Biochem. Biophysics, Supp. 1, 276 (1962) (C.A. 58, 1708a (1963)).

74) Werbebroschüre "Sephadex 2" der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden.

75) P. Flodin, B. Gelotte und J. Porath, Nature [London] 188, 493 (1960).

76) R.L.M. Synge und M.A. Youngson, Biochem. J. 78, 31p (1961).

77) Th. Wieland, P. Duesberg und H. Determann, Biochem. Z. 337, 303 (1963).

78) J.R. Whitaker, Analytic. Chem. 35, 1950 (1963).

79) P. Andrews, Biochem. J. 91, 222 (1964).

80) B.G. Johansson und L. Rymo, Biochem. J. 92, 5p (1964).

81) E. Glueckauf: Ion Exchange and its Applications, Society of Chemical Industry, London 1955, zit. nach Lit. 70).

82) P. Flodin, J. Chromatogr. 5, 103 (1961).

83) J. Kohn, Nature [London] 183, 1055 (1959).

84) Badische Anilin- und Sodafabrik A.G., Ludwigshafen.

85) U. Gehring, Dissertation München 1964.

86) J. Porath, Nature [London] 196, 47 (1962).

87) I.A. Rose in P.D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck: The Enzymes, Academic Press, Inc., New York, London 1962, Band 6, S. 115 ff.

88) E. Baldwin, Dynamic Aspects of Biochemistry, Cambridge University Press 1952, S. 28 ff.

89) H. Lineweaver und D. Burk, J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934).

90) L. Michaelis und M.L. Menten, Biochem. Z. 49, 333 (1913).

91) R.A. Alberty, J.Amer.chem.Soc. 75, 1928 (1953).

92) E.R. Stadtman, J.cellular comparat.Physiol. 41, 89 (1953).

93) L. Jaenicke und F. Lynen in P.D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck: The Enzymes, Academic Press, Inc., New York, London, 2. Auflage 1960, Band 3, S. 3 ff.

94) O.H. Callaghan, Biochem.J. 67, 651 (1957).

95) J.B. Neilands, J.biol.Chemistry 184, 117 (1950).

96) Th. Wieland und G. Pfleiderer, Angew.Chem. 74, 261 (1962).

97) R.D. Sagers, M. Benziman u. S.M. Klein, J.Bacteriol. 86, 978 (1963).

98) S.M. Klein und R.D. Sagers, J.Bacteriol. 83, 121 (1962) (C.A. 56, 13335 (1962)).

99) E. Bamann und M. Meisenheim in E. Bamann und K. Myrbäck: Die Methoden der Ferment-Forschung, Thieme Verlag, Leipzig 1941, S. 1616.

100) O. Dann und P. Nickel, Liebigs Ann.Chem. 667, 101 (1963).

101) Fa. DADE REAGENTS, Inc., Miami, Florida, USA.

102) Die Blutegel wurden geliefert von H. Altmann, Osnabrück, Borsigstr. 17.

103) Kymographion der Fa. S. BOSCH, Freiburg/Brsg.

104) J.H. Quastel, M. Tennenbaum und A.H.M. Wheatley, Biochem.J. 30, 1668 (1936).

105) R. Bentley, J.Amer.chem.Soc. 70, 2183 (1948).

106) A.W.D. Avison, J.chem.Soc. [London], 732 (1955).

107) Herrn Direktor B o e t t c h e r danken wir sehr für die Überlassung von insgesamt 1000 Bienen.
Fräulein U. G ö s c h e l danken wir für ihre Hilfe bei den Vorbereitungen für den Transport.

108) H. K u m a g a i und S. E b a s h i, Nature [London] 173, 871 (1954).

109) F.W. K ü s t e r, Logarithmische Rechentafeln, Walter de Gruyter & Co., Verlag, Berlin 1958.

110) Glasbläserei Konrad V o r n d r a n, Erlangen, Kirchenstr. 9.

111) G. K o r t ü m, Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie, Springer Verlag, Berlin 1962, S. 301 ff.

112) Fa. Carl Zeiss : Gebrauchsanweisung für Spektralphotometer PMQ II, S. 23.

113) Zusammenfassung: R.M. J o h n s t o n e, in R.M. H o c h t e r und J.H. Q u a s t e l : Metabolic Inhibitors, Academic Press Inc., London, New York 1963, Band 2, S. 99 ff.

Dem Fonds der Chemie sind wir zu großem Dank für die Sachbeihilfe zur Beschaffung des LKB-Fraktionsschneiders verpflichtet.

Lebenslauf

Am 18. Februar 1936 wurde ich, Horst Roselieb, als erstes von drei Kindern des Sparkassenangestellten August Roselieb und seiner Ehefrau Helene, geb. Busch, zu Weißenfels/Saale geboren. Da bald darauf mein Vater in Angerapp/Ostpr. die Stelle eines Sparkassendirektors übernahm, wurde ich dort 1942 eingeschult. Nach der Flucht im Herbst 1944 besuchte ich zunächst in Bramsche die Volksschule, dann für zwei Jahre die Mittelschule und bis April 1954 die Oberschule für Jungen in Osnabrück. Durch einen erneuten Umzug gelangte ich nach Aschendorf (Ems) und besuchte bis zur Reifeprüfung am 22. Februar 1956 in Leer/Ostfriesland die Oberschule für Jungen.

Wegen einer akuten Magenerkrankung und einer Blinddarmoperation konnte ich erst ein halbes Jahr später als Apothekerpraktikant in die Schwanen-Apotheke in Papenburg eintreten. Am 29. September 1958 legte ich in Osnabrück mein pharmazeutisches Vorexamen ab. Vom Winter-Semester 1958/59 bis zum Sommer-Semester 1962 studierte ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen Pharmazie und legte dort am 13. August 1962 die pharmazeutische Prüfung ab. Während meines Studiums hatte ich vom 1. Juni 1961 bis 31. Mai 1962 die Stelle einer studentischen Hilfskraft am Institut für Angewandte Chemie inne.

Nach meiner Kandidatenzeit in der Schwanen-Apotheke in Papenburg und der St. Pauls-Apotheke in Fürth/Bayern begann ich am 1. Mai 1963 als wissenschaftliche Hilfskraft mit der Promotionsarbeit bei Herrn Professor Dr. O. D a n n und Herrn Universitätsdozent Dr. H. S u c k e r. Seit 15. April 1964 habe ich die Stelle eines Verwalters einer wissenschaftlichen Assistentenstelle inne.

Am 29. August 1964 heiratete ich Fräulein Frieda K r e u t z e r und nahm meinen Hauptwohnsitz in Muggendorf/Oberfranken.

ooOoo

Offset-Fotodruck
- W. Hogl, Erlangen, Brüxer Straße 9, (Nähe Röthelheimbad) Telefon 15336 -

-b

Offset - Fotodruck

– W. Hogl, Erlangen, Brüxer Straße 9, (Nähe Röthelheimbad) Telefon 15336 –